

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Timo Kürschner

September 2000

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Konstruktion und Screening von Antikörperbibliotheken gegen Oberflächenantigene

Gutachter:

1. Prof. Dr. Melvyn Little
2. Prof. Dr. Heinz Schaller

Danksagung

Allen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben möchte ich danken:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Little für die Überlassung des Themas und die Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Bei Herrn Professor Dr. Heinz Schaller möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Peter Röttgen fürs Korrekturlesen, seine Diskussionsbereitschaft und seine wissenschaftliche Unterstützung.

Vielen Dank auch an Petra Rohrbach für die gute Zusammenarbeit und die fachlichen Diskussionen.

Herzlichen Dank an Ingrid Hermes, Armin Keller und Iris Klewinghaus für die praktische Unterstützung.

Ich danke Herrn Dr. Moldenhauer für seine Unterstützung und die Bereitstellung diverser Materialien.

Vielen Dank an Ingrid Choi, Wolfgang Schmidt, Karsten Tauber, Dr. Stephanie Schmidt, Dr. Concepción de Inés, Dr. Michaela Arndt, Lilli Hofstätter, Dr. Monika Zewe-Welschhof, Dr. Michael Hofmann Dr. Michael Braunnagel, Dr. Fabrice Le Gall, Dr. Sergey Kipriyanov, Dr. Huiping Zhang, Dr. Björn Cochlovius und Alexandra Baehre für das gute Arbeitsklima und die freundliche Zusammenarbeit.

I Inhaltsverzeichnis

I	INHALTSVERZEICHNIS	IV
II	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
III	GLOSSAR	XII
IV	EINLEITUNG	1
4.1	DAS IMMUNSYSTEM	1
4.2	DAS HUMANE IMMUNSYSTEM	1
4.3	HUMANE ANTIKÖRPER	2
4.4	HUMANE REKOMBINATE ANTIKÖRPER	4
4.5	REKOMBINANTE ANTIKÖRPER-EXPRESSIONSBIBLIOTHEKEN IN E. COLI	6
4.6	SCREENING VON ANTIKÖRPERBIBLIOTHEKEN	7
4.7	SCREENING VON SVFV-BIBLIOTHEKEN GEGEN BESTIMMTE TUMORASSOZIIERTE ZELLOBERFLÄCHENANTIGENE	8
V	MATERIAL UND METHODEN	11
5.1	ABIOTISCHES UND BIOTISCHES MATERIAL	11
5.1.1	<i>Chemikalien</i>	11
5.1.2	<i>Enzyme</i>	11
5.1.3	<i>Oligonukleotide:</i>	11
5.1.4	<i>Bakterienstämme</i>	11
5.1.5	<i>Eukaryontische Zelllinien</i>	12
5.1.6	<i>Vektoren:</i>	12
5.2	MEDIEN UND ALLGEMEINE LÖSUNGEN	15
5.2.1	<i>Medien und dafür benötigte Lösungen</i>	15
5.2.2	<i>Antibiotikastammlösungen</i>	17
5.2.3	<i>Sonstige Lösungen</i>	17
5.2.4	<i>Antikörper</i>	22
5.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	24
5.3.1	<i>RNA Methoden:</i>	24
5.3.2	<i>DNA- Methoden</i>	25
5.3.3	<i>Restriktionsverdau von DNA</i>	25
5.3.4	<i>Sequenzierung von DNA</i>	25
5.4	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	28
5.4.1	<i>Elektrotransformation von E.coli (modifiziert nach ((Dower, Miller et al. 1988)))</i>	28
5.4.2	<i>Herstellung einer Bakterienstockkultur</i>	29
5.4.3	<i>Präparation von Wildtyp Phagen</i>	29
5.4.4	<i>Bestimmung des Phagentiters</i>	30
5.4.5	<i>Screening einer Phagemidbibliothek</i>	32

5.4.6	<i>Screening einer Phagemidbibliothek in ELISA-Platten mit Zellen als Antigen</i>	34
5.4.7	<i>ELISA</i>	35
5.4.8	<i>Plattenscreen</i>	38
5.5	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	39
5.5.1	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (modifiziert nach Laemmli (Laemmli 1970))</i>	39
5.5.2	<i>Westernblot (modifiziert nach Towbin et al. (Towbin, Staehelin et al. 1979))</i>	41
5.5.3	<i>Großaufreinigung von löslichen scFv-Fragmenten im pHOG-Vektorsystem</i>	43
5.5.4	<i>Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (IMAC) zur Aufreinigung und Konzentrierung der löslichen scFv-Antikörper aus PPP</i>	43
5.6	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	45
5.6.1	<i>Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität</i>	45
5.6.2	<i>Einfrieren und Auftauen von Zellen</i>	45
5.6.3	<i>Durchflußzytometrie (FACScan-Analyse)</i>	45
VI	ERGEBNISSE	48
6.1	SCREENING EINER AUS 50 SPENDERN KLONierten $4 \cdot 10^9$ PHAGEDISPLAY BIBLIOTHEK GEGEN OBERFLÄCHENANTIGENE.	48
6.1.1	<i>Screening der fünfzig Spenderbibliothek unter Verwendung eines FACSorter</i>	49
6.2	ETABLIEREN EINES ECL-ELISA-SYSTEMS FÜR DIE ULTRASENSITIVE IMMUNOLOGISCHE DETEKTION VON OBERFLÄCHENANTIGENEN IM PHAGEN-ELISA	50
6.3	ANALYSE DER IM FACSSORT ERHALTENEN PHAGENKLONE MITTELS ECL-ELISA	51
6.4	SCREENING DER FÜNFZIG SPENDER BIBLIOTHEK GEGEN HBV-ANTIGENE	55
6.4.1	<i>Aufreinigung der beiden identifizierten Klone</i>	59
6.4.2	<i>Nachweis der Bindung der scFv Antikörper an HBV-Partikeln</i>	60
6.5	KONSTRUKTION EINES NEUEN UNIVERSELLEN PCR PRIMER-SATZES ZUR HERSTELLUNG UNIVERSELLER ANTIKÖRPERBIBLIOTHEKEN	62
6.5.1	<i>Amplifizierung der Immunglobulinketten mit dem ersten Primersatz</i>	71
6.5.2	<i>Einführung von Restriktionschnittstellen in die Produkte der ersten PCR</i>	72
6.6	ÜBERPRÜFUNG DER PRIMERSPEZIFITÄT DER KONSTANTEN PRIMER	73
6.6.1	<i>Test der Primerspezifität durch Restriktionsverdau der Produkte aus der ersten PCR</i>	77
6.7	GENERIERUNG EINER IGM scFv-ANTI-KÖRPERBIBLIOTHEK AUS MILZGEWEBE	79
6.8	KONTROLLE DER KLONIERUNG DURCH EINZELKLONRESTRIKTIONSANALYSE	80
6.9	ERNEUTES SCREENING GEGEN EGP 2 UNTER VERWENDUNG DER NEUEN BIBLIOTHEK MIT EINER KOMPLEXITÄT VON $2 \cdot 10^8$	82
VII	DISKUSSION	88
7.1	SCREENING DER FÜNFZIG SPENDER BIBLIOTHEK GEGEN OBERFLÄCHENANTIGENE	88
7.1.1	<i>Screening mit ELISA-Platten</i>	88
7.1.2	<i>Screening mit einem FACSorter</i>	89
7.1.3	<i>Das ECL-ELISA-System</i>	90

7.1.4	<i>Analyse der im FACSSort erhaltenen Klone durch einen ECL-ELISA, Westernblot, Plattenscreen und Restriktionsverdau</i>	91
7.2	ANTIKÖRPER GEGEN HBV-ANTIGENE	92
7.3	AUFBAU EINER NEUEN SCFV-BIBLIOTHEK AUS MILZGEWEBE	94
7.4	AUFBAU EINER SCFV IGM-BIBLIOTHEK IM MODIFIZIERTEN EXPRESSIONSVEKTOR PEXHAM 1	97
7.5	AUSBLICK	99
VIII ZUSAMMENFASSUNG		100
IX LITERATURVERZEICHNIS		101
X ANHANG		108
10.1	SEQUENZ C9:	108
10.2	SEQUENZ C8:	110

II Abkürzungsverzeichnis

α	anti
A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
a. i.	ad injektibile
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Amp	Ampicilin
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
As	Aminosäure
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine serum albumin
C	Cytosin
cDNA	zur mRNA komplementäre Ns
cfu	colony forming units
cip	"calf intestinal phosphatase" (alkalische Posphatase)
DEAE	Diethylaminoethyl
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
F'	F'-Plasmid
Fa.	Firma
FCS	Fötales Kälberserum
fd	Bakteriophage fd
fM	femtomolar = 10 ⁻¹⁵ Liter
Fv	Bindungsdomäne eines AKs
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
G	Guanin

Abkürzungsverzeichnis

gr	griechisch
h	Stunde
HbsAg	S- Antigen von HBV
HBV	Hepatitis B Virus
H ₂ O ve	vollentsalztes Wasser
HRP	Horse radish peroxidase
Ig	Immunglobulin
IMAC	Metall-Chelat-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-b-D-Thiogalactosid
IR	intergenic region
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
l	Liter
mA	Milli-Ampere
mAK	monoklonaler Antikörper
M _r	relative Molmasse
min	Minuten
μl	Mikroliter = 10 ⁻⁶ Liter
ml	Milliliter = 10 ⁻³ Liter
μM	mikromolar = 10 ⁻⁶ M
mM	millimolar = 10 ⁻³ M
m.o.i.	multiplicity of infection
mRNA	messenger-RNA
ms	Millisekunden
nM	nanomolar = 10 ⁻⁹ M
N-terminal	Amino-terminal
Ns	Nucleinsäure
OD	optische Dichte
ori	"origin of replication" (Startpunkt der Replikation)
p	Plasmid
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
PCR™	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pelB	Signalsequenz der Pectatlyase aus <i>Erwinia carotovora</i>
phOx	2-Phenyl-2-Oxazolin-5-on

Abkürzungsverzeichnis

pfu	plaque forming uits
pM	picomolar = 10^{-12} Liter
Prog.	Progesteron
pSEX	plasmid surface expression vektor
PVP	Phagen-Verdünnungs-Puffer
RBS	Ribosomen binding site
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Saccharose
s	Sekunde
scFv	einkettiger Fv-Antikörper
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-(Puffer)
TBS	Tris-Buffered-Saline
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
Tet ^R	Tetracyclin-Resistenz
TMB	Teramethylbenzidin
TNT	Tris-NaCl-Tween-(Puffer)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3 propandiol)
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
w/v	Weight per volume
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
V _H	variable Domäne der schweren Kette
v/v	Volume per volume
V _L	variable Domäne der leichten Kette
W	Watt

Abkürzungsverzeichnis

Ein- und Dreibuchstabencode für Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Argenin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

Der genetische Code:

Erste Base 5'-Ende	Zweite Base				Dritte Base 3'-Ende
	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop	
	UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp	
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	
	AUG Met / Start	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	

Die Codonhäufigkeit

Erste Base 5'-Ende	Zweite Base								Dritte Base 3'-Ende
	U		C		A		G		
	Mammalia	Gram. neg	Mammalia	Gram. neg	Mammalia	Gram. neg	Mammalia	Gram. neg	
U	40,7%	47,5%	18,3%	16,1%	40,2%	50,6%	42,7%	38,0%	U
	59,3%	52,5%	23,5%	18,0%	59,8%	49,4%	57,3%	52,2%	
	5,4%	9,4%	14,2%	10,7%	23,2%	57,2%	59,6%	33,2%	
	12,2%	15,0%	5,9%	15,4%	17,2%	9,7%	100%	100%	
C	12,1%	9,9%	28,8%	15,2%	38,8%	50,1%	9,1%	36,9%	U
	20,8%	12,1%	32,7%	13,3%	61,2%	49,9%	19,5%	40,4%	
	6,8%	3,3%	27,3%	17,1%	26,1%	29,8%	10,7%	5,6%	
	42,8%	53,7%	11,2%	54,4%	73,9%	70,2%	18,2%	9,6%	
A	33,3%	42,6%	23,4%	18,8%	41,4%	37,8%	13,4%	11,8%	U
	53,6%	50,1%	38,5%	45,3%	58,6%	62,2%	24,8%	28,0%	
	13,1%	7,3%	26,4%	11,5%	37,6%	70,5%	21,0%	4,3%	
	100%	100%	11,8%	24,4%	62,4%	29,5%	21,5%	3,2%	
G	16,4%	25,9%	28,8%	17,2%	42,6%	55,2%	17,6%	32,9%	U
	25,6%	23,9%	40,2%	29,2%	57,4%	44,8%	34,1%	45,6%	
	9,9%	16,0%	21,0%	19,3%	39,9%	65,5%	25,5%	9,2%	
	48,1%	34,2%	9,9%	34,3%	60,1%	34,5%	22,8%	12,3%	

III Glossar

Unter einem **Blot** versteht man die Übertragung von Proteinen oder Nukleinsäuren auf geeignete Trägermaterialien. Die Übertragung kann entweder mittels Kapillartransfer oder durch Elektrotransfer erfolgen. Ein Proteinblot wird als Western Blot bezeichnet, ein DNA-Blot bezeichnet man als Southern Blot und einen RNA-Blot als Northern Blot.

CDR's (*complementarity determining regions*) sind hypervariable Bereiche eines Immunglobulins oder eines Rezeptors die mit dem Liganden in Kontakt treten und die Spezifität bestimmen.

c-myc ist ein Onkogen, das für einen zellulären Transskriptionsfaktor kodiert, der unter anderem die Cyclin A Expression reguliert. Die Sequenz eines bestimmten Epitops, gegen das es einen monoklonalen Antikörper gibt, wird zum Nachweis der Proteinexpression in Expressionsvektoren verwendet.

Die Durchflußzytometrie **FACS** (Fluoreszenz-aktivierter-Zellscanner) ist ein Verfahren zur Zählung und Charakterisierung von Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom. Mindestens fünf Parameter einer Zelle lassen sich damit gleichzeitig bestimmen.

Als **Fab-Fragmente** (*Fragment antigen binding*) werden die "Arme" mit den antigenbindenden Bereichen des Antikörpers bezeichnet, die bei einem partiellen Verdau mit Papain entstehen. Sie bestehen aus der gesamten leichten Kette sowie V_H und C_{H1} der schweren Kette.

Als **Fc-Fragment** (*fragment crystallizable*) bezeichnet man, den Dritten, nicht Antigen bindenden Teil des Antikörpers, der neben den beiden Fab-Fragmenten nach einem Papainverdau entsteht. Hierbei handelt es sich um die konstanten Regionen der einzelnen Antikörperisotypen, bestehend aus C_{H2} und C_{H3} jeder schweren Kette.

FRs (*framework regions*) sind Regionen innerhalb der variablen Bereiche eines Immunglobulins oder eines Rezeptors, die ein Proteingerüst für die mit den Antigenen in Kontakt tretenden hypervariablen Bereiche bilden.

Haptene sind kleine niedermolekulare Substanzen, die an Antikörper binden, alleine jedoch keine Immunreaktion auslösen können. Nur wenn man sie an einen makromolekularen Träger wie z.B. Proteine koppelt, sind sie in der Lage eine Immunreaktion auszulösen.

Antikörper mit gleichem **Idiotyp** (*gr. idios für eigen*) erkennen die gleiche Antigenepitope und stammen i.d.R. von einer bestimmten B-Zelle.

Mit **Isotypen** bezeichnet man die verschiedenen Klassen von Antikörpern, die sich in ihrer konstanten Region unterscheiden. Diese konstante Region wird bei jeder Antikörperklasse von einem eigenen Gen kodiert.

Ein **Linker** ist ein synthetisches Oligonukleotid, das für ein kurzes Peptidstück kodiert. Linker werden unter anderem dazu verwendet, zwei Peptidketten miteinander zu verbinden, dabei sollen sie die dreidimensionale Struktur des Proteins möglichst wenig stören.

Monoklonale Antikörper sind Antikörper mit einer bestimmten Spezifität, die von einer B-Zelle abstammen.

Die **Multiplicity of infection (m.o.i.)** ist das Verhältnis zwischen infektiösen Phagenpartikeln und Bakterien.

Mit **Panning** bezeichnet man den gesamten Screeningprozeß mit Bindung eines Phagmidpartikels an immobilisiertes Antigen und den anschließenden stringenten Waschschritten zur Selektion von Antikörpern.

Unter einer **Phagenbibliothek** versteht man eine rekombinante Proteinbibliothek, bei der die Proteine, auf der Oberfläche eines Phagen präsentiert werden. Das Gen für das jeweilige Protein ist dabei im Genom des Phagen integriert und im Phagenpartikel enthalten.

Als **Phagemid** werden Vektoren bezeichnet, die aus Teilen normaler Klonierungsvektoren und aus Bereichen des Genoms einzelsträngiger DNA-Phagen zusammengesetzt sind.

“**Plating**” **Bakterien** sind Bakterien, die zur Phagentiter Bestimmung verwendet werden. Hierzu müssen die Bakterien von dem zu titrierenden Phagenstamm infizierbar sein.

Geeignete “plating” Bakterien für den Bakteriophagen M13 KO7 sind z.B. *E.coli*, XL1-Blue.

IV Einleitung

4.1 *Das Immunsystem*

Für jeden Organismus ist es wichtig, fremd und eigen unterscheiden zu können. Nur so ist ein Organismus in der Lage, seinen Zellenverband vor Eindringlingen zu schützen. Jeder Organismus muß sich ständig einer riesigen Fülle feindlicher Keime, wie z.B. Viren, Bakterien, Pilze, Mykoplasmen oder auch größere Parasiten, sowie deren Sekreten (z.B. Toxine), auseinandersetzen. Im Laufe der Phylogenese wurden die Abwehrmechanismen immer komplexer und gipfelten im Immunsystem der Vertebraten. Neben ausgedehnten unspezifischen Abwehrmechanismen, mechanischer, chemischer oder biologischer Art, besitzen sie ein äußerst komplexes Immunsystem. Das am höchsten entwickelte Immunsystem unter ihnen haben die Säugetiere. Sie verfügen über eine ausgedehnte humorale und zelluläre Immunantwort, sowie über ein immunologisches Gedächtnis.

4.2 *Das humane Immunsystem*

Das menschliche Immunsystem besitzt eine komplexe humorale und zelluläre Immunantwort. Zur zellulären Immunantwort zählt man die zellvermittelte Immunität, die im wesentlichen in das Aufgabengebiet der T-Lymphozyten und der natürlichen Killerzellen fällt. Diese Zellen können infizierte Körperzellen direkt erkennen und abtöten. Außerdem können sie Makrophagen aktivieren, die daraufhin Pathogene in Vesikel aufnehmen und sehr wirkungsvoll zerstören. Die T-Lymphozyten sind ferner erforderlich für die B-Zell Aktivierung, gegen die meisten Antigene und damit auch für die Auslösung eines wesentlichen Teiles der humoralen Immunantwort.

Zur humoralen Immunität gehören das Komplementsystem und die Antikörper. Antikörper können auf verschiedene Weise zur Immunität beitragen, z. B. indem sie das Pathogen mit neutralisierenden Antikörpern am Eindringen in eine Wirtszellen hindern. Diese Antikörper hemmen die Infektiosität von Viren und intrazellulär lebenden Bakterien. Dies kann durch neutralisierende Bindung an Rezeptoren, die für ein Eindringen der Pathogene in die Wirtszelle notwendig sind, geschehen. Daneben ist die Neutralisierung durch Antikörper auch ein wirksamer Schutz gegenüber Toxinen. Die zweite Strategie des Immunsystems mit Krankheitserregern fertig zu werden, betrifft Organismen die sich extrazellulär vermehren.

Sie werden durch Opsonisierung bekämpft. Hierunter versteht man die Bedeckung der Oberfläche des Pathogens mit Antikörpern, wodurch dieses für phagocytierende Zellen markiert wird. Zu diesen phagocytierenden Zellen gehören die eosinophilen und die neutrophilen Zellen, sowie die Makrophagen. Diese Zellen erkennen mit ihren Fc-Rezeptoren die auf der Oberfläche gebundenen Antikörper und beginnen darauf hin mit der Phagocytose. Die dritte Verteidigungslinie bildet das Komplementsystem. Das Komplementsystem ist eine Art Mehrkomponentengift, das schließlich zur Lyse der Mikroorganismen führt. Die Aktivierung kann sowohl durch Antikörper (*klassischer Weg*), als auch spontan durch die Bindung von aktivierten Komplementkomponenten an die Oberfläche eines Pathogens, erfolgen (*alternativer Weg*). Die Gesamtheit dieser Mechanismen bezeichnet man als humorales Immunsystem, da die Körperflüssigkeiten früher als Humores (v. lat. *umor*, die Flüssigkeit) bezeichnet wurden.

4.3 Humane Antikörper

Die B-Lymphozyten eines Menschen produzieren etwa 10^6 - 10^8 verschiedene Antikörper. Die Antikörpervielfalt entsteht durch die Rekombination verschiedener Genabschnitte. Für jeden dieser Genbausteine gibt es mehrere Vertreter, deren zufällige Kombination führt zur großen Komplexität des humanen Antikörperrepertoires (Tomlinson 1997). Jeder B-Zellklon produziert dabei nur einen bestimmten Antikörper mit gleichem Idiotyp, d.h. mit der gleichen Antigenbindungsstelle. B-Lymphozyten sind in der Lage, verschiedene Immunglobulinklassen bzw. -subklassen von Antikörpern zu erzeugen (IgM, IgD, IgG1+2+3+4, IgA1+2, und IgE). Die einzelnen Isotypen unterscheiden sich nur in ihrer konstanten Region voneinander. Jeder Isotyp kann von einer B-Zelle mit dem gleichen Idiotyp exprimiert werden.

Da die allgemeinen strukturellen Merkmale bei allen Isotypen gleich sind, soll hier der Aufbau an einem IgG Antikörper exemplarisch dargestellt werden.

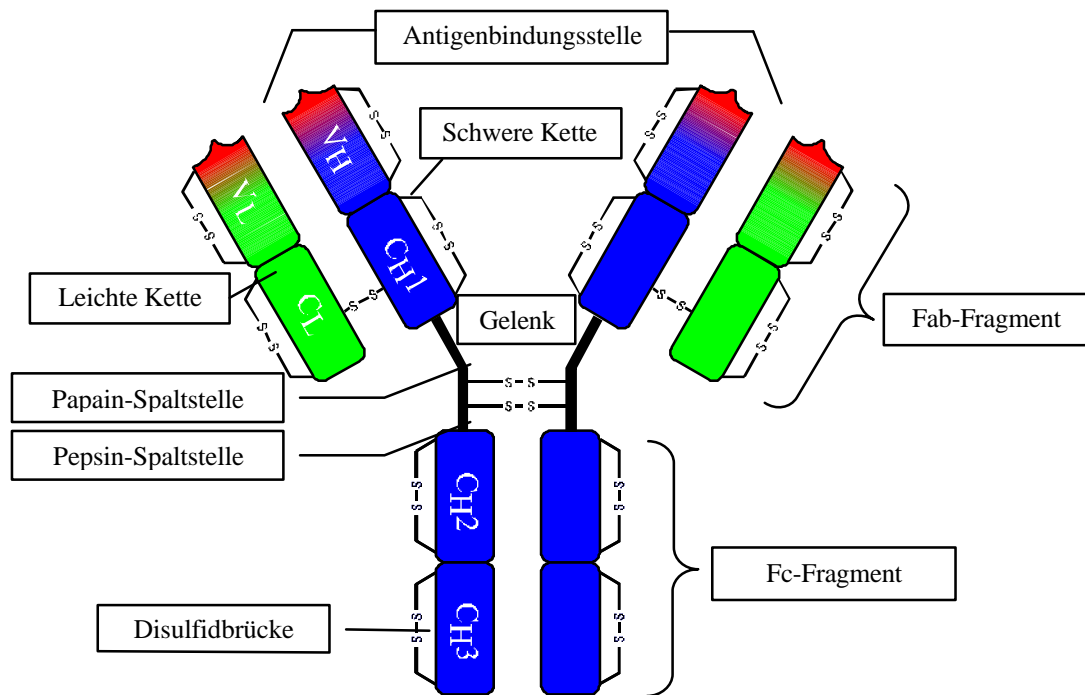


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines IgG Antikörpers

Ein Antikörper besteht aus vier Untereinheiten, zwei schweren und zwei leichten Ketten. Die schweren Ketten sind in der Gelenkregion über zwei Disulfidbrücken untereinander verbunden. Die leichten Ketten sind über jeweils eine weitere Disulfidbrücke mit den schweren Ketten verbunden. Die schwere und die leichte Kette besteht aus je einer variablen Domäne (V_L oder V_H) und einer konstanten Domäne im Falle der leichten Kette bzw. aus drei konstanten Domänen im Falle der schweren Kette (C_L1 sowie C_H1 , C_H2 , C_H3). Andere Isotypen unterscheiden sich von IgG Molekülen durch Anzahl und Sequenz dieser Domänen, IgM und IgE fehlt zu dem eine klar definierte Gelenkregion. Die Grundstruktur der einzelnen Domänen besteht aus zwei Lagen Polypeptidketten in β -Faltblatt Konformation, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind und eine zylindrische Form ergeben. Diese Grundstruktur wird als Immunglobulindomäne bezeichnet.

Die variablen Domänen setzen sich zusammen aus relativ konstanten Bereichen, den sogenannte FR Regionen (*framework region*) und hypervariablen Bereichen, den CDR Regionen (*complementary determining region*). Die Gerüstregionen FR1, FR2, FR3 und FR4 bilden die beiden parallelen β -Faltblätter und somit die strukturelle Basis der variablen Domäne. Die CDR Regionen, CDR1, CDR2 und CDR3, sind variable Schleifen am Rande der Faltblätter, sie sind die Antigen bindenden Bereiche des Antikörpers und erzeugen die Vielfalt unterschiedlicher Bindungsspezifitäten. Durch Erzeugung unterschiedlicher CDR's

und durch Kombination von unterschiedlichen variablen Regionen der schweren Kette mit verschieden variablen Regionen der leichten Kette entsteht die kombinatorische Variationsbreite der Antikörper (Tonegawa 1983; Alzari, Lascombe et al. 1988; Kabat 1991).

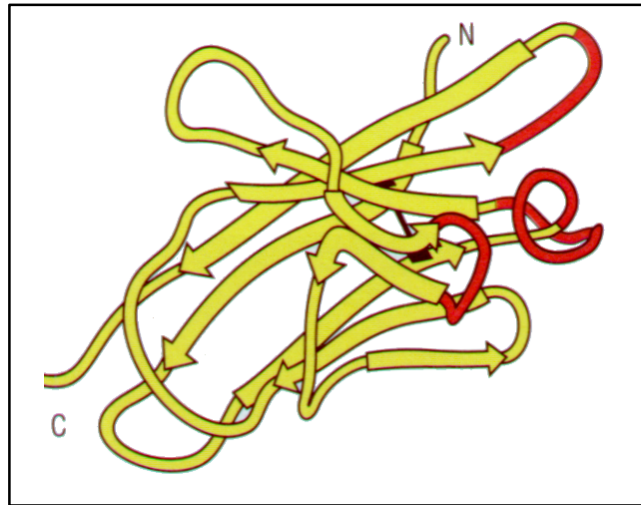


Abbildung 2: Schematische Darstellung der variablen Region einer Antikörperkette. Die hypervariablen Regionen sind rot dargestellt. Im Antikörper führt die Paarung der schweren und der leichten Kette die CDR's beider Ketten zusammen so entsteht die hypervariable Oberfläche, die die antigenbildende Stelle bildet.

Die konstanten Regionen des Fc-Teils vermitteln die Effektorfunktion der Immunglobulinisotypen. Durch sie wird das Komplementsystem aktiviert, oder sie werden von Rezeptoren erkannt, wodurch z.B. Makrophagen zur Phagozytose stimuliert werden.

4.4 Humane rekombinate Antikörper

Antikörper wurden schon sehr früh zu Therapie in Form von Seren eingesetzt. Bereits 1890 wurden Pferdeseren zur Behandlung von Patienten, die an Diphtherie erkrankt waren eingesetzt (Behring and Kitasato 1890). Hierzu wurde Pferden der Krankheitserreger injiziert. Nach erfolgter Immunisierung wurde Serum aus diesen Tieren isoliert und Patienten, die an Diphtherie erkrankt waren, injiziert. Später folgten Seren gegen ClostridiumTetani, Clostridium Botulinum u.a. Krankheitserreger. Der wiederholte Einsatz eines aus Tieren gewonnenen Serums ist jedoch sehr begrenzt, da diese Seren stark immunogen sind. Ein weiterer Nachteil von Seren ist ihre Polyklonalität. Diese Seren enthalten ein Antikörpermischung, von dem nur einer oder wenige Antikörper die gewünschte Spezifität haben. Dieses Problem wurde durch die Entwicklung der Hybridom-Technologie im Jahre 1975 durch Köhler und Milstein gelöst (Köhler and Milstein 1975). Hierbei werden die

Antikörper produzierenden B-Lymphozyten durch Fusion mit einer Tumorzelllinie immortalisiert. Da bei dieser Methode nur ein einziger B-Lymphozyt mit der Tumorzelle verschmolzen wird, stammt die daraus resultierende Zelllinie von einem einzelnen Klon ab und produziert monoklonale Antikörper. Durch dieses Verfahren wurden mehrere Antikörper mit diagnostischem und therapeutischem Potential hergestellt (Maloney, Grillo-Lopez et al. 1997; Milstein 1994; Grossbard 1998). Aber auch diese Antikörper sind wegen ihres murinen Ursprungs stark immunogen. Wie schon bei den Seren erkennt das menschliche Immunsystem die in einem anderen Organismus gebildeten Immunglobuline als fremd. Im Falle der monoklonalen Antikörper kommt es dann zur humanen anti-Maus Antikörperantwort (HAMA-Response), weshalb der wiederholte Einsatz von monoklonalen Antikörper bei therapeutischen Anwendungen zu immer stärkeren Immunreaktionen führt und so nicht oder nur eingeschränkt möglich ist (Courtenay-Luck, Epenetos et al. 1986; Lamers, Gratama et al. 1995).

Zur Vermeidung solcher Immunreaktionen sind humane Antikörper nötig. Humane Antikörper wurden zunächst aus Seren von immunisierten Spendern gewonnen, die Verfügbarkeit solcher Seren ist aber eng begrenzt (Ratner 1943). Eine weitere Möglichkeit der Herstellung von humanen monoklonalen Antikörpern ist die Transformation von B-Lymphozyten mit Epstein Barr Viren (EBV). Später gelang es mit Hilfe der Hybridomtechnik humane monoklonale Antikörper herzustellen (Carson and Freimark 1986).

Diese Methoden sind jedoch limitiert durch die Instabilität der Lymphozytentumorzelllinie, geringe Antikörperproduktion oder die Verfügbarkeit geeigneter Spender (Glassy and Dillman 1988; Zaccolo, Roggero et al. 1992).

Eine vielversprechende Alternative zu den oben erwähnten Methoden ist die Herstellung von humanen rekombinanten Antikörperfragmenten. Dabei werden die humanen Gene mittels molekularbiologischer Techniken isoliert, amplifiziert und in einem geeigneten Expressionssystem exprimiert (Huston, Levinson et al. 1988; Winter and Milstein 1991; Skerra and Plückthun 1988; Huse, Sastry et al. 1989).

Hat man die Gene erst einmal isoliert, kann man sie modifizieren und auf die verschiedensten Weisen neu kombinieren. Die Koexpression der variablen Bereiche der Immunglobulinketten erzeugt Fv-Fragmente, die jedoch sehr instabil sind. Nimmt man die CH1 Domänen dazu erhält man Fab-Fragmente. Diese sind stabiler, da sie eine Disulfidbrücke enthalten. Verbindet man die Gene für die variablen Regionen, der schweren und der leichten Kette, mit Hilfe eines kurzen Peptidstücks als Linker, so entsteht der recht stabile „single chain“ Antikörper (scFv). Dadurch sind scFv-Fragmente wesentlich stabiler als die anderen

Fragmente (Bird, Hardman et al. 1988; Huston, Mudgett-Hunter et al. 1991; Skerra and Pluckthun 1991)

Auf Basis dieser Fragmente lassen sich neben vollständigen Antikörpern, auch künstliche Antikörper generieren. Dabei werden z.B. scFv-Fragmente mit einzelnen konstanten Immunglobulin-domänen verbunden um Effektorfunktionen zu vermitteln, nicht benötigte Domänen werden weggelassen und so eine Art Miniantikörper erzeugt (Choi 1998).

4.5 Rekombinante Antikörper-Expressionsbibliotheken in *E. coli*

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht es, antikörperkodierende c-DNA mit Hilfe von Primern spezifisch zu amplifizieren. Dadurch läßt sich ein Großteil des Antikörperrepertoires des Menschen molekularbiologisch isolieren und anschließend für den Aufbau komplexer Antikörperbibliotheken nutzen.

Hierzu wird seit Anfang der neunziger Jahre meist ein Phagemidsystem benutzt. Dabei wird das Prinzip der klonalen Selektion des Immunsystems *in vitro* auf Bakterien übertragen. Ein Phagemid ist ein Vektor, der die Expression eines Proteins, beispielsweise ein scFv-Antikörper, als Fusionsprotein mit einem Phagenprotein erlaubt.

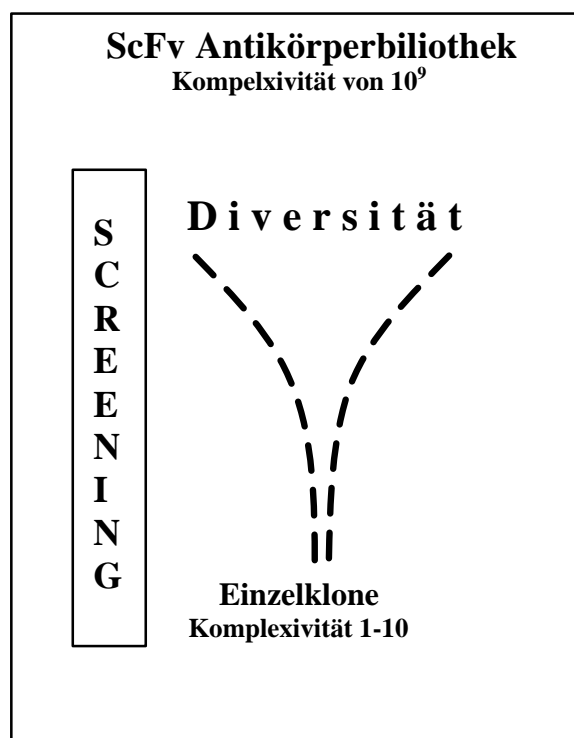
Basis des Phagemidsystems ist die Gruppe der relativ kleinen (Genomgröße ca. 6,5kb) filamentösen Phagen (z.B. M13KO7, fd, F1). Die Phagemidvektoren verfügen neben einem bakteriellen Replikationsursprung und einem Resistenzgen über ein Verpackungssignal (intergenic region IR), das es ihnen ermöglicht, in Phagenpartikel verpackt zu werden. Wird ein Bakterium mit solch einem Vektor transformiert und zusätzlich mit einem Helferphagen infiziert, produziert es rekombinante Phagemidpartikel. Das an ein Phagenprotein fusionierte Protein wird auf der Oberfläche des rekombinanten Phagen exprimiert. Die DNA, die für das Fusionsprotein kodiert, wird in die Phagen verpackt. Das für eine Fusion geeignetste Phagenprotein ist pIII, mit dessen N-terminalen Ende das Protein fusioniert wird. Die Phagmide mit dem scFv-pIII Protein werden auf Grund der besonderen Struktur der IR-Region bevorzugt verpackt. Dadurch enthalten nur wenige rekombinante Phagenpartikel Helferphagen-DNA. Auf diese Weise wurde die in den B-Lymphozyten vorhandene Kopplung eines speziellen Antikörpergens mit einem Antikörperprotein in ein prokaryontisches System übertragen.

In den letzten Jahren sind ein ganze Reihe von Antikörperbibliotheken entstanden. Neben universellen IgM Bibliotheken auch spezielle IgG oder IgE Pateintenbibliotheken. Bei diesen ist die Wahrscheinlichkeit einen speziellen Antikörper gegen ein bestimmtes oder eine

Gruppe von Antigenen zu erhalten größer als bei universellen Bibliotheken. Außerdem ist die Wahrscheinlichkeit einen Antikörper mit hoher Affinität zum Antigen zu isolieren größer. Nur bei sehr großen universellen Bibliotheken hat man ähnlich gute Chancen. (Marks, Hoogenboom et al. 1991; Steinberger, Kraft et al. 1996; Welschhof 1996; Sheets, Amersdorfer et al. 1998; Little, Welschhof et al. 1999). Eine weitere Möglichkeit, die Komplexität von Antikörperbibliotheken zu steigern, ist die Generierung von semisynthetischen Bibliotheken (Knappik, Ge et al. 2000; Braunagel and Little 1997). Hierbei werden die CDR 3-Bereiche der schweren Kette gezielt mutiert. Auch vollkommen synthetische Bibliotheken, bei den alle CDR-Bereiche mutiert sind, sind möglich. So veränderte Antikörper unterliegen nicht der negativen Selektion des menschlichen Immunsystems.

4.6 Screening von Antikörperbibliotheken

Beim Screening von Antikörperbibliotheken wird die klonale Selektion des Immunsystems nachgeahmt. Aus einer großen Anzahl unabhängiger Klone wird ein Antikörper mit definierter Spezifität selektiert. Durch die Kopplung von Gen und Protein im Phagemidsystem können Bibliotheken gebaut werden, die nach den gleichen Prinzipien, Antikörpervielfalt und klonale Selektion, die sich auch im Immunsysteme finden, auf Antikörper durchsucht werden.



Die komplexesten Antikörperbibliotheken bestehen aus etwa 10^{10} - 10^{11} unterschiedlichen Klonen. Der Aufbau noch komplexerer Bibliotheken ist auf Grund der Transformationseffizienz von etwa 10^6 - 10^8 pro Elektrotransformation sehr schwierig. Außerdem nehmen die Volumen die gehandhabt werden müssen immer mehr zu¹.

Um aus einer komplexen Antikörperbibliothek einen selten darin vorkommenden Antikörper zu isolieren, wird ein sehr gutes Selektionssystem benötigt. Ein bestimmter Phage wird dabei durch Bindung an sein Antigen selektioniert. Hierfür wurde eine Reihe von Verfahren entwickelt. Die besten Erfolgchancen hat man, wenn das Antigen in reiner Form zu Verfügung steht und an eine feste Phase gekoppelt werden kann. Hierfür eignen sich z.B. Plastikröhrchen, ELISA-Platten oder kleine magnetische Eisenpartikel (Hoogenboom, Henderikx et al. 1998). Die Phagen werden mit dem immobilisierten Antigen inkubiert, unspezifisch bindende Phagenantikörper werden anschließend gewaschen und die eluierten Phagenantikörper erneut in *E.coli* vervielfältigt. Mit den erhaltenen Phagen kann eine neue Selektionsrunde durchgeführt werden, diesen Prozeß bezeichnet man als „Panning“. Führt man es mehrmals hintereinander aus, so kann es zu einer Anreicherung von Antikörpern gegen das eingesetzte Antigen kommen. Ein ungünstiger Umstand dieser recht erfolgreichen Methoden ist aber die Tatsache, daß das Antigen in gereinigter Form oder mindestens ein Epitop als Peptid vorliegen muß. Dies ist aber bei sehr vielen interessanten Zelloberflächenantigenen, die z.B. neu entdeckt wurden schwierig und nur mit erheblichem Zeitaufwand möglich. Screeningmethoden bei denen man Zellen oder Gewebe direkt verwenden kann besonders interessant sind.

4.7 Screening von svFv-Bibliotheken gegen bestimmte tumorassoziierte Zelloberflächenantigene

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst, die kurz zuvor im Labor entwickelte Methode des „whole cell screenings“ mit ELISA-Platten verwendet. In einem Modelscreening konnte gezeigt werden, daß mit auf einer ELISA-Platte fixierten Zellen, Phagen die scFv-Fragmente präsentieren angereichert werden können. Als Modelbibliothek wurde eine Mischung von anti-CD5- und anti-PhOx-Phagen verwendet. Der CD5 Phage war zuvor aus einem Hybridom umklont worden. Es konnte gezeigt werden, daß nach zwei Selektionsrunden eine

¹ In einen ml Flüssigkeit passen etwa 10^{13} - 10^{14} M13KO7 Phagen und man benötigt etwa 1-10L Bakterienkultur um sie zu produzieren

spezifische Anreicherung von CD5-Phagen möglich ist (Schmidt 1997; Schmidt, Braunagel et al. 1999).

Als alternative Methode wurde ein Screeningverfahren getestet, bei dem mit Hilfe eines FACSSorters, Zellen, zusammen mit den auf deren Oberfläche gebundenen Phagen, sortiert werden. Auf diese Weise gelang es bereits scFv-Antikörperfragmente gegen Blutlymphozytensubpopulationen zu isolieren. (de Kruif, Terstappen et al. 1995; Lekkerkerker and Logtenberg 1999).

Diese beiden Methoden haben den Vorteil, daß sich direkt antigenpräsentierende Zellen verwenden lassen und so die Zelloberflächenantigene in ihrer nativen Form erhalten bleiben. Zum Screening der Bibliotheken wurden folgende drei Antigene eingesetzt:

CD 20-ein humanes B-Zelldifferenzierungsantigen

CD 20 ist ein Protein mit 4 Transmembrandomänen, dessen C und N-Termini im Cytosol lokalisiert sind und eine geringe Internalisierungsrate besitzt. Dadurch ist es Ideal für eine Tumorthherapie mit unkonjugierten oder radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpern geeignet. Außerdem ist CD 20 in einer hohen Kopienzahl auf der Zelloberfläche der meisten B-Zell-Lymphome zu finden (Nadler, Ritz et al. 1982). Dies macht es zu einem geeigneten Zielmolekül, da durch bispezifische Konstrukte oder Radioimmunkonjugate, Lymphomzellen spezifisch abgetötet werden können, ohne, daß Stamm- oder Plasmazellen geschädigt werden (Kuzel and Rosen 1994). Ein chimärer monoklonaler Antikörper IDEC-C2B8 (Rituximab) wird bereits therapeutisch eingesetzt. (Maloney, Grillo-Lopez et al. 1997). Das Antigen stand in Form einer transgenen Mausfibroblastenzelllinie zur Verfügung.

Egp2 ein panepithelialer Tumor Marker

Epitheliales Glykoprotein 2 (Egp2 oder auch CO17-1A, Ep-Cam) ist ein panepitheliales Tumorantigen, d.h. es ist auf vielen Tumoren die von epithelialen Gewebe abstammen, wie z.B. Kolon- oder Lungen-Karzinome, überexprimiert. Egp2 ist etwa 38kD groß. Es existieren mehrere monoklonale Antikörper (z.B. 17-1A, Moc-31, Moc-161) gegen das Antigen (Roovers, Henderikx et al. 1998). Der monoklonale 17-1A Antikörper wurde bereits bei Patienten mit Kolon-Karzinomen in klinischen Studien eingesetzt (Riethmuller, Holz et al. 1998). Jedoch entwickelten die meisten Patienten im Laufe der Therapie eine HAMA Antwort. Allerdings hat diese im Falle des 17-1A Antikörpers keine negativen Auswirkungen auf die Therapie (Gruber, van Haarlem et al. 2000). Trotzdem könnte sich ein humaner

Antikörper als effektiver erweisen, da seine Aktivität nicht durch anti idiotypische Antikörper eingeschränkt werden könnte.

HBV-L-Protein

In der Lipidhülle des HBV Viruses findet man 3 Proteine **L**(large), **M**(middle) und **S**(small)-Protein. Allen drei Proteine bestehen aus dem S-Protein, das bei M und L um preS2 oder preS2 plus preS1 verlängert wird. Auch bei dem HBV-L-Protein handelt es sich um ein Tumorantigen. Man findet es fast immer (97%) in hepatozellulären Karzinomen. In 32% der Fälle ist es sogar in der Plasmamembran zu finden (Wee, Yap et al. 1991). Zum Screening stand neben rekombinanten preS1 und preS1/2 auch aufgereinigtes L-Protein zur Verfügung.

Ziele der Arbeit:

Ziel der vorliegenden Dissertation war es scFv-Antikörper gegen Tumor assoziierte Zelloberflächenantigene durch die Verwendung von großen scFv-Antikörperbibliotheken und die Etablierung geeigneter Screeningverfahren zu isolieren. Dabei wurden mehrere Teilaspekte bearbeitet:

- Screening einer aus fünfzig, nicht immunisierten, Spendern erstellten scFv- Antikörper Bibliothek, gegen die oben dargestellten Zelloberflächenantigene.
- Etablierung eines sensitiveren ELISA-Systems zur Detektion der Zelloberflächenantigene
- Verbesserung der Qualität von Antikörperbibliotheken durch verschiedene methodische Änderung bei der Konstruktion von scFv-Bibliotheken.

V Material und Methoden

5.1 *Abiotisches und biotisches Material*

5.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben wurden Chemikalien in der Qualität p.A. von den Firmen Serva (Heidelberg), Fluka (Neu-Ulm), Sigma (München), Loewe Biochemica GmbH (München), Roth (Karlsruhe), und Merck (Darmstadt) bezogen.

5.1.2 Enzyme

Enzyme wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim), New England Biolabs (Bad Schwalbach), Fermentas (St. Leon Rot), Promega (Genf) oder Stratagene (Heidelberg) bezogen.

5.1.3 Oligonukleotide:

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von W.Weinig (Oligo-Sequenzierungsgruppe, Abteilung angewandte Tumorstudiologie, DKFZ) hergestellt oder von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen.

5.1.4 Bakterienstämme

E.coli XL1-Blue (Bullock 1987): *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(*r_k*⁻, *m_k*⁺), *supE44*, *relA1*, (F'*proAB*, *lacI*^qΔ*M15*, Tn10) (Stratagene).

5.1.5 Eukaryontische Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden von Dr. G. Moldenhauer (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

L-8-30: Murine L-Zellen (Fibroblasten), die mit CD23 transfiziert wurden.

L-BP-50: Murine L-Zellen, die mit CD40 transfiziert wurden.

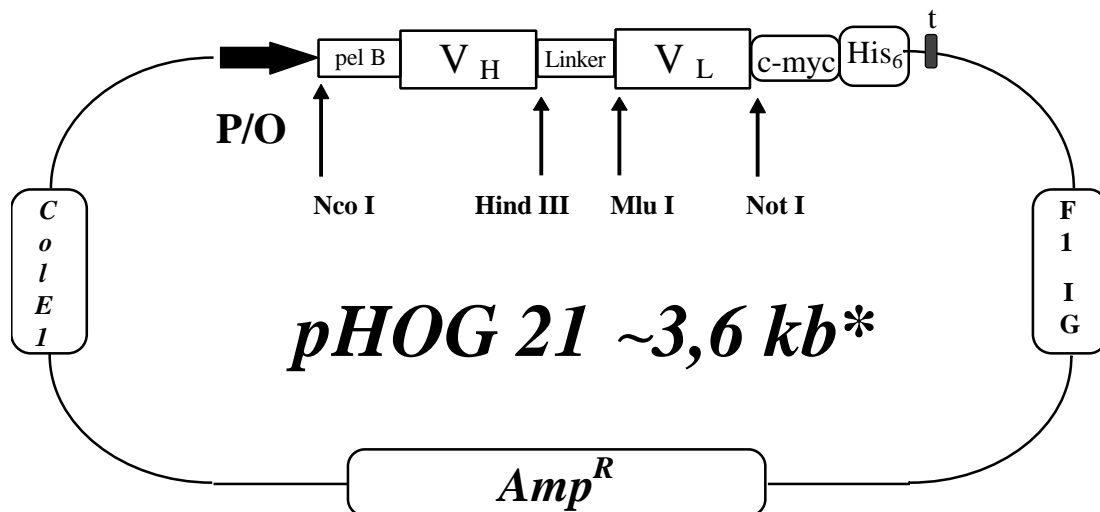
L-VB1: Murine L-Zellen, die mit CD20 transfiziert wurden.

DA3: Eine Maus-Mamma-Karzinomzelllinie.

Egp2: DA3 Zelllinie die mit dem Egp2 Antigen transfiziert wurde.

5.1.6 Vektoren:

pHOG21:

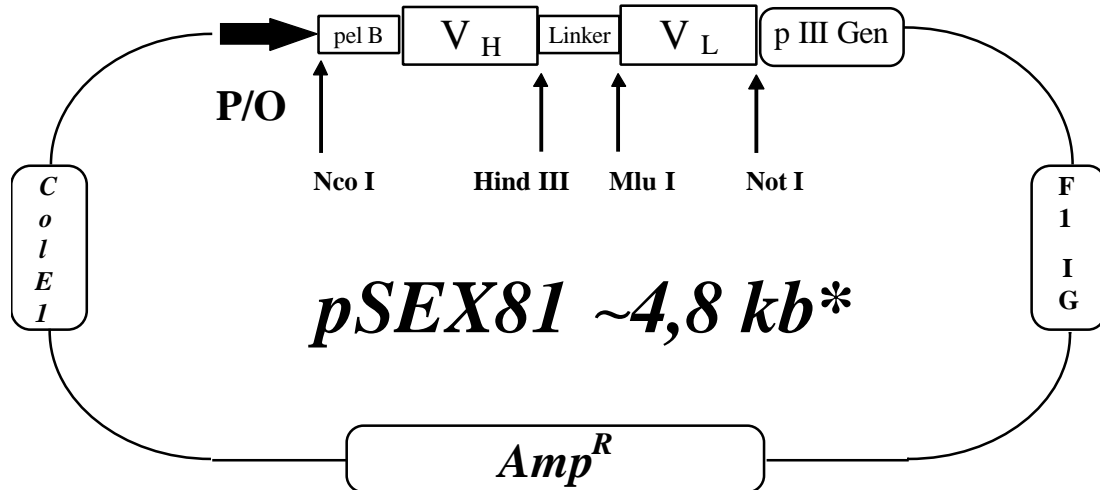


* Die exakte Größe ist abhängig vom jeweiligen Insert

Abbildung 3: Schematische Vektorkarte von pHOG 20 und 21. Die Vektoren basieren auf dem Plasmid pBR322+. **Amp^R**, Ampicillinresistenzgen; **f1 IG**, die intergenic Region des Phagen f1, diese Region dient als Verpackungssignal für Helferphagen der Stämme fd, M13 und Verwandte; **ColE1**, ist der „origin of replication“ also der Startpunkt der Replikation, diese Sequenz ermöglicht die Vermehrung des Vektors als Plasmid; **P/O**, wt lac Promotor und Operator mit einer starken RBS; **pel B**, Signalsequenz des Enzyms Pectatlyase aus *Erwinia carotovora*, die Sequenz am N-terminalen Ende ermöglicht dem Fusionsprotein den Transport in das Periplasma, die Sequenz wird hierbei abgespalten; **pIII Gen**, diese Gen kodiert für das pIII Protein des Phagen f1; **V_H**, variable Region der schweren Kette eines Antikörpers; **V_L**, variable Region der leichten Kette eines Antikörpers;

Linker, diese Sequenz verbindet die beiden Antikörperketten zum scFv, gebräuchliche Linker sind der **Yol-linker** oder der **Gly-Ser-Linker**, c-myc, diese Sequenz codiert für das c-myc-Epitop. (Kipriyanov, Kupriyanova et al. 1996)

pSex81:



* Die exakte Größe ist abhängig vom jeweiligen Insert

Abbildung 4: Schematische Vektorkarte von pSEX81. Der Vektor basiert auf dem Plasmid pBluescript SK⁺. **Amp^R**, Ampicillinresistenzgen; **f1 IG**, die intergenic Region des Phagen f1, diese Region dient als Verpackungssignal für Helferphagen der Stämme fd, M13 und Verwandte; **ColE1**, ist der „origin of replication“ also der Startpunkt der Replikation, diese Sequenz ermöglicht die Vermehrung des Vektors als Plasmid; **P/O**, wt lac Promotor und Operator mit einer starken RBS; **pel B**, Signalsequenz des Enzyms Pectatlyase aus *Erwinia carotovora*, die Sequenz am N-terminalen Ende ermöglicht dem Fusionsprotein den Transport in das Periplasma, die Sequenz wird hierbei abgespalten; **pIII Gen**, dieses Gen kodiert für das pIII Protein des Phagen f1; **V_H**, variable Region der schweren Kette eines Antikörpers; **V_L**, variable Region der leichten Kette eines Antikörpers; Linker, diese Sequenz verbindet die beiden Antikörperketten zum scFv, gebräuchliche Linker sind der **Yol-linker** oder der **Gly-Ser-Linker**.

pEXHAM 1:

Wie pSex81 jedoch mit einen Stop Codon (amber TAG) Mutation zwischen dem Histidin und einem c-myc-Marker, so daß in einem *E.coli*-Stamm der das Stop Codon nicht unterdrückt

rekombinanter Antikörper ohne weiteres Umklonieren erzeugt werden kann (Dr. Peter Röttgen pers. Mitteilung).

5.2 Medien und allgemeine Lösungen

5.2.1 Medien und dafür benötigte Lösungen

1x LB Medium	10g	Bacto-Trypton (Difco, # 0127-01-7)	1,0% (w/v)
	5g	Bacto-Hefeextrakt (Difco, # 0127-01-7)	0,5% (w/v)
	10g	NaCl	170 mM
	ad 1l ddH ₂ O auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren		
2x YT:	17g	Bacto-Trypton	1,7% (w/v)
	10g	Bacto-Hefeextrakt	1% (w/v)
	5g	NaCl	85 mM
	ad 1l ddH ₂ O auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren		
SOB-Medium:	20g	Bacto-Trypton	2% (w/v)
	5g	Bacto-Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	500mg	NaCl	10 mM
	190mg	KCl	2,5 mM
	ad 990ml ddH ₂ O auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren		
	vor dem Gebrauch:		
	10ml	MgCl ₂	10 mM
SOC-Medium:	100ml	SOB-Medium plus	
	1ml	Glukose	20 mM
	sterilfiltrieren		
M9-Medium ² :	10ml	10x M9-Salze	
	1ml	100xM9-Zusatz	
	5ml	Glukose	100 mM
	ad 100ml ddH ₂ O auf pH 7,0 einstellen		
	autoklavieren		
M9-Agarplatten:	100ml	M9 Salze plus	
		Bacto Agar	1,5% (w/v)
	ad 940ml ddH ₂ O autoklavieren		
	Direkt vor dem gießen der Platten:		
	5ml	100x M9-Zusatz und	

² Direkt vor Versuchsbeginn ansetzen.

Material und Methoden

	25ml	Glukose-Lösung zugeben. Agarplatten in Folie verpacken bei 4°C lagern	
10x M9-Salze:	74,8g	Na ₂ HPO ₄ x2 H ₂ O	420 mM
	23,5g	NaH ₂ HPO ₄ x1 H ₂ O	170 mM
	5,0g	NaCl	85 mM
	10,0g	NH ₄ Cl	187 mM
		ad 1l ddH ₂ O,autoklavieren	
100x M9-Zusatz:	1ml	MgSO ₄ -Lösung	100 mM
	1ml	CaCl ₂ -Lösung	10 mM
	30µl	Fe(III)Cl ₃	300 µM
	60µl	Thiamin-Lösung	3 mM
		Sterilfiltrieren	
MgCl ₂ -Lösung:	9,5g	MgCl ₂ x6 H ₂ O	1 M
		ad 100ml ddH ₂ O	
MgSO ₄ -Lösung:	12,3g	MgSO ₄ x7 H ₂ O	1 M
		ad 50ml ddH ₂ O,autoklavieren	
CaCl ₂ -Lösung:	0,74g	CaCl ₂ x2 H ₂ O	100 mM
		ad 50ml ddH ₂ O,autoklavieren	
Fe(III)Cl ₃ -Lösung:	1,35g	Fe(III)Cl ₃ x6 H ₂ O	100 mM
		ad 50ml ddH ₂ O,autoklavieren	
Thiamin-Lösung ³ :	1,69g	Thiamin (Serva, # 36.020)	500 mM
		ad 10ml ddH ₂ O, sterilfiltrieren und bei -20°C aufbewahren.	
Glukose-Lösung:	180g	α-D-Glukose	2 M
		ad 500ml ddH ₂ O sterilfiltrieren und bei -20°C aufbewahren.	
Agarplatten:		1 Liter Medium der gewünschte Spezifität	
	15g	Bacto Agar	1,5% (w/v)

³ Vitamin B1

Agarplatten in Folie verpacken
bei 4°C lagern

5.2.2 Antibiotikastammlösungen

Ampicillin:	100xStocklösung	
500mg	Ampicillin (Serva, # 13.397)	5 mg/ml
	ad 100ml ddH ₂ O.	
	Sterilfiltrieren und bei -20°C aufbewahren.	
Kanamycin:	100xStocklösung	
500mg	Kanamycin (Serva, # 30.250)	5 mg/ml
	ad 100ml H ₂ O.	
	Sterilfiltrieren und bei -20°C aufbewahren.	
Tetracyclin:	100x Stocklösung	
300mg	Tetracyclin (Boehringer #109428)	3 mg/ml
	ad 100ml 50% Ethanol	
	Sterilfiltrieren und bei -20°C aufbewahren.	

5.2.3 Sonstige Lösungen

Blocklösung 2%:	1g	Entfettetes Milchpulver	2% (w/v)
		ad 50ml PBS oder H ₂ O	
Blocklösung 4%:	2g	Entfettetes Milchpulver	4% (w/v)
		ad 50ml PBS oder H ₂ O	
10x Blottingpuffer:	Tris	150 mM	
	Glycin	2,5 M	
	ad 1l H ₂ O		
Blottingpuffer:	100ml	10x Blottingpuffer	
		Methanol	10% (v/v)
		ad 1l H ₂ O	
Carbonatpuffer:	NaHCO ₃	40 mM	
	NaCO ₃	15 mM	

Material und Methoden

Einfriermedium:	DMSO	10% (v/v)
	FCS (inaktiviert 30min 56°C)	90% (w/v)
	bei -20°C lagern	
PBS:	Na ₂ PO ₄ , pH7,2	50 mM
	NaCl	140 mM
PBST:	Na ₂ PO ₄ , pH7,	50 mM
	NaCl	140 mM
	Tween 20	0,1% (v/v)
PEG/NaCl-Lösung:	200g Polyethylenglycol 6000	20 % (w/v)
	146,1g NaCl	2,5 M
	ad 1000 ml mit ddH ₂ O autoklavieren und bei RT lagern	
PPP-Lösung:	Tris/HCl pH 8	50 mM
	Saccharose	20% (w/v)
	EDTA	1 mM
	auf Eis vorkühlen	
PVP:	Tris/HCl pH 7,5	10 mM
	NaCl	20 mM
	EDTA pH 7,5	2 mM
	autoklavieren und bei RT lagern	
TNT:	Tris pH7,5	10 mM
	NaCl	140 mM
	Tween 20	1% (v/v)
TMB:	Peroxidase Substrate	
	Kit von Kierkegaard-Perry-Labs, Nr. 507600	
	bezogen über Bibby-Dunn,Asbach. Ein nichttoxischer Kit mit hoher Sensitivität	
Triethylamin:	100mM Triethylamin nicht autoklavieren da hitzeempfindlich	
Tris/HCl:	121g Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-1-3-propandiol NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃) gewünschten pH mit HCl einstellen ad 1000 ml ddH ₂ O	1 M
Ponceau S-Lösung:	Ponceau S (Sigma, München # P7767)	0,2% (w/v)

Material und Methoden

	Trichloressigsäure	3% (v/v)
	Sulfosalicylsäure	3% (w/v)
	Bei RT aufbewahren	
FCS-Lösung :	FCS in TNT	20% (w/v)
	bei -20°C aufbewahren.	
TBS:	Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
	NaCl	150 mM
	Bei RT aufbewahren.	
DAB-Substratlösung:	10ml TBS	
	200µl DAB-Stammlösung	
	H ₂ O ₂ ⁴	0,005% (v/v)
Kobaltpuffer:	TBS plus	
	CoCl ₂	1% (w/v)
	Bei -20°C aufbewahren	
DAB-Stammlösung:	25mg/ml Diaminobenzidin in PBS	
	In Portionen bei -20°C aufbewahren.	
TE:	Tris-HCl (pH 7,4)	10 mM
	EDTA	1 mM
	autoklavieren und aufbewahren bei RT.	
TAE:	50x Stocklösung:	
	242 g Tris-HCL (pH 8)	
	57,1ml Eisessig	
	100ml EDTA	0,5 M
	Bei RT aufbewahren.	
DNA-Probenpuffer:	10x Stocklösung	
	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Xylencyanol	0,25% (w/v)
	Saccharose in ddH ₂ O	60% (v/v)
	Sterilfiltrieren und bei RT aufbewahren	

⁴ Frisch ansetzen

Material und Methoden

Ethidiumbromid:	10 mg/ml	Ethidiumbromid in ddH ₂ O Dunkel aufbewahren bei 4°C.	
SDS-Probenpuffer:	2x Stocklösung		
	125 mM	Tris-HCl (pH 6,8)	
		Mercaptoethanol	10% (v/v)
		Bromphenolblau	0,025% (w/v)
		Glycerin	10% (v/v)
		Bei RT aufbewahren.	
LA1:		Tris-HCl (pH 6,8)	30 mM
		Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,8% (w/v)
		ad 100ml H ₂ O.	
		Bei 4°C aufbewahren.	
LA2:	32,5g	Acrylamid (Roth, Karlsruhe)	
	0,8g	Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)	
		ad 100ml H ₂ O.	
		Lichtgeschützt bei 4°C aufbewahren.	
LA4:		Tris-HCl (pH 8,8)	300 mM
		Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,8% (w/v)
		ad 100ml H ₂ O.	
		Bei 4°C aufbewahren.	
APS:		Ammoniumpersulfat in Wasser	10% (w/v)
		Frisch ansetzen oder in Portionen bei -20°C einfrieren.	
TEMED:		N,N,N,N-Tetramethylethylen-diamin von Bio Rad, München Bei 4°C aufbewahren	
Elektrodenpuffer (PAGE):	10x Stocklösung		
		Tris	250 mM
		Glycin	2 M
		ad 2l H ₂ O	
		Bei RT aufbewahren.	
SDS-Laufpuffer:		1xElektrodenpuffer plus Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,1% (w/v)

Material und Methoden

DMSO 10%:	Aufbewahren bei RT.	
	DMSO (Sigma,)	10% (v/v)
	in ddH ₂ O	

5.2.4 Antikörper

Maus anti-pVIII:

Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen das pVIII Protein des fd Phagens; bezogen bei Amersham Pharmacia, Braunschweig

Yol1/34 (Ratte anti-Tubulin):

Monoklonaler AK aus der Hybridomzelllinie Yol1/34, der das Interne Tubulin Epitop ..EEGEFSEAR.. erkennt, von Dr. Moldenhauer (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Maus anti c-myc:

Monoklonaler Antikörper(9E10) aus der Maus, der das interne c-myc Epitop ..EQKLISEEDL.. erkennt; bezogen über Cambridge research biochemicals, England

Ziege anti-Maus HRP:

Polyklonales IgG Serum aus der Ziege das mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt wurde; bezogen bei Dianova, Hamburg.

Ziege anti-Maus FITC:

Polyklonales IgG Serum aus der Ziege, das mit Flouresceinisoithiocyanat (FITC) gekoppelt wurde; bezogen bei Dianova, Hamburg.

HEA125:

Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen das Egp2 Antigen, von Dr. Moldenhauer (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

FE 2:

Monoklonaler Antikörper aus der Maus, der gegen das pVIII Protein des fd Phagen gerichtet ist, bezogen bei Pharmacia, Freiburg.

Maus anti-Histidin:

Monoklonaler Antikörper gegen ein Peptid, das aus fünf Histidinresten besteht, bezogen von Dianova, Hamburg.

Maus anti-PIII:

Monoklonaler Antikörper aus der Maus der gegen das pIII Protein des fd Phagen gerichtet ist, bezogen bei MoBiTec, Göttingen

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 RNA Methoden:

5.3.1.1 Gesamt-RNA-Isolation aus humanem Gewebe

Aus Milzbiopsiematerial wird die Gesamt-RNA unter stark denaturierenden Bedingungen (Guanidinisoithiocyanat GITC und β -Mercaptoethanol), welche die RNase Enzymaktivitäten sofort inhibieren und so einen Abbau der zellulären RNA verhindern, isoliert. Nach erfolgter Homogenisierung mittels Ultraturrax⁵ und Lyse der Zellen wird die Gesamt-RNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silikamembran gebunden, wovon sie mittels Wasser eluiert wird. Hierzu wurde der „Rneasy Midikit“ und das Protokoll von Qiagen, (Hilden) benutzt.

5.3.1.2 mRNA- Extraktion

Die mRNA Isolierung erfolgte mit dem Oligotex-mRNA-Kit der Firma Qiagen, (Hilden). Hierbei handelt es sich um eine Affinitätsaufreinigung der mit einem poly-Adenosinschwanz versehenen mRNA, über eine Säule aus Polystyrol-Latexkugeln, an die kovalent ca. 30bp lange Oligo-dT-Nukleotide gekoppelt sind. Die Ausbeute an mRNA beträgt gewöhnlich 1-5%, wobei 2% üblich ist.

5.3.1.3 c-DNA-Synthese

Durch reverse Transkription der mRNA mittels Oligo-dt-Primer wird einzelsträngige cDNA hergestellt. Hierzu wurde der SUPERScript™ II RNase H–Reverse Transcriptase-Kit der Firma GIBCOBRL, Karlsruhe verwendet. Der Kit enthält eine gentechnisch veränderte, in *E.coli* exprimierte, reverse Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus, welche keine RNaseH Aktivität mehr besitzt und somit kein mRNA-Template im Hybridmolekül abbauen kann. Für eine Reaktion werden 50-500ng mRNA eingesetzt.

⁵ Hierbei ist darauf zu achten, daß ein Gefäß mit runden Boden verwendet wird, damit das Gewebe möglichst fein homogenisiert wird.

5.3.2 DNA- Methoden

5.3.2.1 Plasmidpräparationskit

Plasmidpräparationen wurden mit den Produkten der Firma Qiagen (Hilden) nach den mitgelieferten Anweisungen durchgeführt.

Die DNA wird bei diesem Verfahren nach dem Prinzip der alkalischen Lyse gewonnen und durch Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt.

5.3.3 Restriktionsverdau von DNA

Der entsprechende Puffer und die Restriktionsenzymmenge werden nach Herstellerangaben ausgewählt. Bei einem Restriktionsansatz ist darauf zu achten, daß der Glycerinanteil nicht höher als 5%(v/v) ist. Ist einem Restriktionsenzym 50%(v/v) Glycerin vom Hersteller zugesetzt worden, so darf dessen Volumen am gesamten Restriktionsansatz nicht mehr als 10% (v/v) ausmachen. Je nach Anzahl der Schnittstellen und der eingesetzten DNA-Menge ist die benötigte Menge an Restriktionsenzym zu berechnen. Die Aktivität eines Restriktionsenzym wird in Units gemessen. Eine Unit schneidet ein Mikrogramm der Referenz-DNA in einer Stunde. Für einen analytischen Ansatz werden ca. 0,5µg DNA eingesetzt.

5.3.4 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung wurde auf einem ABI 377 von der Fa. MediGene, Martinsried bei München, durchgeführt. Das Gerät arbeitet nach dem Cycle-Sequencing Verfahren. Die Ergebnisse werden in Form eines Fluorogrammes dargestellt.

5.3.4.1 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden die Moleküle aufgrund ihrer Ladung und Größe in einem Gel aufgetrennt. Die Agarosegelelektrophorese wird vor allem zur Auftrennung von DNA benutzt. Bei Nukleinsäuren ist die Ladung der Moleküle proportional zum

Molekulargewicht, weil jedes Nukleotid eine negativ geladene Phosphorsäuregruppe enthält, daher kommt es bei linearisierter DNA zu einer exakten Auftrennung nach dem Molekulargewicht. Je nach dem gewünschtem Prozentsatz des Gels, eine bestimmte Menge Agarose in 1xTAE lösen.

Für Gele von 0,8% bis 2,0% (w/v) wurde Seakem LE Agarose von FMC verwendet und für 3% (w/v) Agarosegele wurde die low-melting NuSieve® GTG® Agarose ebenfalls FMC verwendet, bezogen über Biozym, Hameln

Agarose durch Kochen im Mikrowellenherd in Lösung bringen, auf 55°C abkühlen lassen, Ethidiumbromid zugeben (0,5 µg/ml Endkonzentration) und in einen Gelträger gießen. In 1x DNA-Probenpuffer gelöste DNA auftragen. Das Gel bei maximal 5-6 V/cm laufen lassen. Nach Auftrennung der Banden unter UV-Licht auswerten.

5.3.4.2 Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Saiki, Gelfand et al. 1988)

Durch die PCR können DNA-Fragmente *in vitro* enzymatisch beliebig oft vervielfältigt werden. An den Enden der zu vervielfältigenden DNA muß ein Stück Sequenz bekannt sein, damit zwei gegenläufige Oligonukleotid-Primer hergestellt werden können. Ferner können durch die Wahl geeigneter Mutationen Restriktionsschnittstellen in die Primer eingeführt werden.

Das am häufigsten für die PCR verwendete Enzym ist die Taq-DNA-Polymerase (Sigma), von der außer der nativen Form zahlreiche gentechnisch modifizierte Formen vorliegen. Alle Varianten haben aber Probleme mit der Amplifikation von DNA-Abschnitten die zur Ausbildung partiell doppelsträngiger Bereiche neigen, z.B. durch „stem-loop“ Strukturen. Aus diesem Grund, wurde bei der Konstruktion von Bibliotheken, statt dessen, die ebenfalls thermostabile *exo⁻*-Vent-DNA-Polymerase, aus *Thermococcus litoralis* (New England Biolabs), verwendet. Da die *exo⁻*-Vent-DNA-Polymerase eine deutlich geringere Fehlerrate beim Nukleotideinbau zeigt als die Taq-Polymerase, war dieses Enzym für die Amplifikation von humanen Immunglobulinen zur Bibliothekkonstruktion besonders geeignet.

Reaktionsansatz soweit nicht anders beschrieben:

je 25 pmol der benötigten 5' und 3' Primer

je 300 μ M dATP, dGTP, dCTP, dTTP

1/10 Vol 10x Polymerasepuffer (New England Biolabs)

1 U DNA-Polymerase

ad 50 μ l ddH₂O

Die PCR wurde, soweit nicht anders beschrieben, auf einem Multi Cyclor PTC200 mit Dualblöcken und Heizdeckel (Firma Biozym) durchgeführt.

Bei der Vielzahl der durchgeführten Reaktionen kann hier kein vollständiges Protokoll, in bezug auf Annealingtemperaturen, Reaktionszeiten und Zyklenzahl angegeben werden. Die Werte sind im Ergebnisteil aufgeführt.

5.4 Mikrobiologische Methoden

5.4.1 Elektrotransformation von *E.coli* (modifiziert nach ((Dower, Miller et al. 1988)))

5.4.1.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Die gewünschten Bakterien werden auf M9-Agar ausplattiert. Inkubation 24-48 h bei 37°C. 5 ml LB-Medium werden mit einer Einzelkolonie von der M9 Platte angeimpft. Inkubation über Nacht bei 37°C und 280rpm (Starterkultur). Am nächsten Tag werden 500 ml LB-Medium mit der kompletten Starterkultur angeimpft.

- Inkubation bei 37°C und 280rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6⁶.
- Die Kultur wird auf Eiswasser etwa 10 min gekühlt und in einem vorgekühlten Rotor bei 4000g 15 min bei 4°C abzentrifugiert
- Der Überstand wird möglichst vollständig entfernt und das Pellet vorsichtig in 500 ml autoklavierten, eisgekühlten Wasser resuspendiert. Danach Zentrifugation in einem vorgekühlten Rotor, 15 min, bei 4000g und 4°C.
- Der Überstand wird möglichst vollständig entfernt und das Pellet vorsichtig in 250 ml autoklavierten, eisgekühlten Wasser resuspendiert. Danach erneut Zentrifugation in einem vorgekühlten Rotor 15 min bei 4000g und 4°C.
- Der Überstand wird möglichst vollständig entfernt und das Pellet vorsichtig in 5 ml 10%iger Glycerinlösung resuspendiert. Die Konzentration sollte mindestens 5x10⁹ Zellen/ml betragen⁷.

Die Zellen werden aliquotiert und bei -80°C gelagert. So hergestellte elektrokompente Zellen sind mindestens sechs Monate haltbar⁸.

⁶ Bei den Kulturschritten kann zum Medium Antibiotikum zugegeben werden, wenn es der verwendete Stamm erfordert. Einige Stämme neigen sonst dazu, während des folgenden Verfahrens bereits enthaltene Plasmide zu verlieren (z.B. das F-Plasmid in *E.coli* SURETM).

⁷ Für besonders gute Resultate kann das Volumen der Glycerinlösung reduziert werden, so daß die Zellkonzentration bei >10¹¹ Zellen/ml liegt.

⁸ Neben Sterilität aller verwendeten Geräte bzw. Argumenten und zügigem Arbeiten, ist besonders die Temperatur von entscheidender Bedeutung. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt darf die Temperatur der Bakterien bis zur Suspension in 10% Glycerinlösung niemals über 4°C liegen. Die Durchführung der Resuspensionsschritte, im Kühlraum, ist im Sommer, daher empfehlenswert.

5.4.1.2 Elektroporation

Die kompetenten Bakterien werden auf Eis aufgetaut. In einem vorgekühlten Polypropylenröhrchen werden 40µl kompetente Bakterien mit 50-100ng DNA gemischt und für 1 Minute auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Gemisch in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und in das Elektroporationsgerät (Gene Pulser, Biorad, München) eingesetzt. Die Einstellung des Geräts beträgt 25µF, 200Ω und für Küvetten mit 0,2cm Elektrodenabstand 2,5kV bzw. für Küvetten mit 0,1cm Elektrodenabstand 1,75kV. Die Zeitkonstante während der Elektroporation sollte größer als 4,2 msec sein. Sofort nach dem Stromimpuls wird der Elektroporationsansatz mit SOC-Medium auf 1ml aufgefüllt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wird 1/100 auf einer LB-Agarplatte mit Antibiotikum ausplattiert und für 16 Stunden bei 30-37°C inkubiert. Bei der Herstellung von scFv-Bibliotheken werden geeignete Verdünnungen zur Titerbestimmung der Bakteriensuspension ausplattiert. Der Rest wird auf einer SOB_{GA}-Agarplatte (22*22 cm, Nunc) verteilt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag in jeweils 15ml 2xYT_{GA} Medium resuspendiert und zu Glycerinstocks weiterverarbeitet. Je Transformationsansatz können ca. 10⁶⁻⁷ transformierte Bakterien hergestellt werden.

5.4.2 Herstellung einer Bakterienstockkultur

Eine Bakterien-ÜN-Kultur wird mit 20% (v/v) Glycerin vermischt und das Ganze bei -80°C gelagert.

5.4.3 Präparation von Wildtyp Phagen

Für die Verpackung von Phagemidvektoren werden Wildtyp Helferphagen benötigt. Dies sind Phagen die alle Proteine, die für die Verpackung benötigt werden, zur Verfügung stellen, deren Genom selbst aber mit einer geringeren Effizienz als die Phagemidvektoren verpackt werden (Dotto, Enea et al. 1981).

- *E.coli* XL1-Blue auf einer M9-Agarplatte ausstreichen und bei RT 3 Tage inkubieren.

- 5 ml 2xYT-Medium von einer M9-Agarplatte animpfen. Inkubation ÜN bei 37°C und 280rpm im Schüttler.
- 400ml 2xYT-Medium mit 1ml der ÜN-Kultur animpfen und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,05 wachsen lassen.
- $2 \cdot 10^{11}$ Helfer Phagen zugeben dies entspricht einer m.o.i. von 2. 30 min bei 37°C langsam mit 60-80rpm schütteln.
- 6 - 10 Stunden bei 37°C und 280rpm schütteln lassen.
- In 50ml Röhrchen überführen und 10 min bei 4°C und 6200g (Heraeus-Megafuge, Rotor 3360, 6000rpm).
- Zu dem Überstand ein 1/5 Vol. PEG/NaCl-Lösung geben und vorsichtig mischen und ÜN bei 4°C die Phagen fällen.
- 30 min bei 4°C und 6200g (Heraeus-Megafuge, Rotor 3360, 6000rpm) zentrifugieren. Pellet in 4ml PVP resuspendieren und in Eppendorfgefäße überführen. 5 min bei 15000g (Heraeus-Biofuge, 13000rpm) abzentrifugieren.
- Überstand abziehen, portionieren und bei 4°C lagern. Der Titer sollte im Bereich von 10^{12} - 10^{13} cfu/ml liegen.

5.4.4 Bestimmung des Phagentiters

Der Phagentiter kann auf zwei verschiedene Weisen bestimmt werden. Zum einen durch „colony forming units“ (cfu), zum anderen durch „plaque forming units“ (pfu). Bei der ersten Methode werden infektiöse Phagen bzw. Phagemid-DNA enthaltende Partikel nachgewiesen (cfu), bei der zweiten werden ausschließlich infektiöse und replikationsfähige (pfu) Partikel nachgewiesen. Für beide Methoden benötigt man „plating“ Bakterien, die zuvor zu präparieren sind.

5.4.4.1 Präparation von Plating Bakterien:

Auf einer M9 Minimalmediumplatte *E.coli* XL-1 Zellen ausstreichen und für 3 Tage bei RT inkubieren.

Mit einer Einzelkolonie von dieser M9 Platte werden 20 ml 2xYT-Medium angeimpft und im Schüttler bei 37°C und 280rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6-0,9 inkubiert.

Die so gewonnenen Plating Bakterien können dann mit den Phagenverdünnungen infiziert werden. Im Ausnahmefall können die Bakterien bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert werden. Die Lagerdauer sollte möglichst kurz sein.

5.4.4.2 Phagentiter Bestimmung mittels Colony forming units (cfu)

Diese Methode bietet sich an, wenn die infizierenden Phagen oder Phagemidpartikel eine Antibiotikaresistenz tragen.

- Von der zu titrierenden Phagenlösung wird eine Verdünnungsreihe in PVP-Puffer angelegt.
- Zu 10 µl der Verdünnung werden nun 90 µl „plating“ Bakterien gegeben und gründlich, aber vorsichtig gemischt⁹.
- Inkubation bei 37°C für 45min.
- Ausstreichen der Zellen auf einer LB- oder SOB-Platte mit entsprechendem Antibiotika Zusatz.
- Inkubation ÜN bei 37°C.
- Auszählen der Kolonien.

5.4.4.3 Phagentiter Bestimmung mittels Plaque forming units (pfu)

Der Phagentiter der mit dieser Methode bestimmt wird beinhaltet ausschließlich die replizierfähigen Phagenpartikel.

- Von der zu titrierenden Phagenlösung wird eine Verdünnungsreihe in PVP-Puffer angelegt.
- Zu 10 µl der Verdünnung werden nun 90 µl „plating“ Bakterien gegeben und gründlich, aber vorsichtig gemischt⁹.
- 4 ml auf 48°C vorgewärmten Top Agar zugegeben, mischen und das Ganze sofort auf einer LB Agarplatte verteilen.
- Inkubation ÜN bei 37°C.
- Am nächsten wird der Titer durch auszählen der Plaques bestimmt.

⁹ Bei zu heftigem Schütteln können die F-Pili der Bakterien abgeschert werden wodurch ihre Infizierbarkeit verloren geht.

5.4.5 Screening einer Phagemidbibliothek

Mit diesem Screeningverfahren wird die klonale Selektion des Immunsystems *in vitro* nachempfunden, die Selektion eines Antigen spezifischen Antikörpers aus Millionen von Antikörpern. Zu diesem Zweck wird ein spezielles Plastikröhrchen mit einem Antigen beschichtet. In dieses Röhrchen gibt man dann eine Phagemidbibliothek. Phagen, die auf ihrer Oberfläche einen für dieses Antigen spezifischen Antikörper tragen werden gebunden und bei der folgenden Waschprozedur im Röhrchen zurückgehalten (panning). Die auf diese Weise selektierten Phagen werden z.B. mit einer Base eluiert und zur Infektion von *E.coli* verwendet. Diese angereicherte Bibliothek wird erneut verpackt und in der nächsten Screeningrunde eingesetzt. Nach mehrfacher Wiederholung des Vorgangs (3-5 mal) ist die Anreicherung soweit fortgeschritten, daß sich eine Analyse einzelner Klone lohnt.

- Maxi-Sorb Röhrchen werden mit dem gewünschten Antigen beschichtet; 10-125 µg Antigen werden zu diesem Zweck in 3,5 ml Carbonatpuffer gelöst. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler.
- Röhrchen 3x mit 1 ml PBS waschen.
- Blocken der Röhrchen mit 2% Milchpulver in PBS, Inkubation 1,5 h bei RT im Überkopfschüttler.
- 10¹¹ Phagen in 4 ml 2% Milchpulver in PBS lösen und > 30 min bei RT präabsorbieren.
- Zum „Panning“ die präabsorbierte Phagenlösung in das mit dem Antigen beschichtete Röhrchen geben.
- Inkubation 30 min bei RT im Überkopfschüttler, dann 90 min bei RT ruhen lassen.
- Röhrchen 20x mit 1 ml PBS/Tween 0,1% auf dem Vortex waschen¹⁰.
- Röhrchen 20x mit 1 ml PBS auf dem Vortex waschen.
- Zur Elution werden 1ml Triethylamin in das Röhrchen gegeben, 5 min vorsichtig bei RT schütteln.

¹⁰Dabei ist darauf zu achten, daß die Waschlösung das ganze Röhrchen benetzt.

Material und Methoden

- Die Lösung wird durch Zugabe von 1ml 1M Tris/HCl, pH7,5 neutralisiert und sofort auf Eis gestellt.
- Dieses Eluat wird dann zu 20 ml logarithmisch wachsenden *E.coli* XL1-Blue gegeben. Zur Präparation dieser Bakterien werden 20ml 2xYT_{GT} mit einer Kolonie XL1-Blue von einer Minimalmedium Platte angeimpft und bei 37°C und 280rpm geschüttelt, bis sie eine OD₆₀₀ ca. 0,4 erreicht haben.
- Inkubation 1h bei 37°C zuerst 15 min mit 80rpm dann 45 min mit 280rpm schütteln.
- Zellen bei RT mit 2400g (Heraeus-Megafuge, Rotor 3360, 3000rpm) 10min abzentrifugieren.
- Zellen in 1ml 2xYT-Medium resuspendieren. Ein kleiner Teil der Zellen wird zur Titerbestimmung verdünnt und ausplattiert, der Rest auf 145mm SOB_{GAT} Agarplatten verteilt. Die Zahl der Agarplatten richtet sich nach der zu erwartenden Ausbeute; für 10⁶⁻⁷ Zellen sollten drei Agarplatten verwendet werden.
- Inkubation ÜN bei 37°C. Am nächsten Morgen werden die Kolonien mit einem gläsernen Drigalskispatel von den Platten abgelöst und in ca 20 ml 2xYT-Medium aufgenommen.
- Mit dieser Kultur werden 50 ml 2xYT_{GAT}-Medium angeimpft. Die OD₆₀₀ sollte nach dem Animpfen ca. 0,025 betragen.
- Inkubation bei 37°C und 280rpm im Schüttler bis eine OD₆₀₀ von 0,1 erreicht ist.
- 5 * 10¹¹ M13KO7 Helferphagen zugeben, dies entspricht einer moi von ca.20.
- Inkubation bei 37°C und 80rpm für 15 min im Schüttler.
- Inkubation bei 37°C und 280rpm für 45 min im Schüttler.
- Kultur bei 4000g (Heraeus-Megafuge, Rotor 3360, 4500rpm) 10min abzentrifugieren.
- Pellet in 50 ml 2xYT_{AK}-Medium vorsichtig resuspendieren¹¹.
- Inkubation bei 37°C und 280rpm für 5h im Schüttler.
- Kultur bei 4000g (Heraeus-Megafuge, Rotor 3360, 4500rpm) 10min abzentrifugieren.
- Der Überstand wird mit 1/5 Vol. PEG/NaCl gemischt, in dieser Lösung werden die Phagen über Nacht bei 4°C gefällt.
- Die PEG-Fällung bei 4°C und 6200g (Heraeus-Megafuge, Rotor 3360, 6000rpm) 10min abzentrifugieren; der Überstand wird möglichst vollständig entfernt und verworfen.
- Pellet in 1 ml PVP-Puffer resuspendieren und in Eppendorfgefäße überführen.
- 5 min bei 15000g (Heraeus Biofuge A, 13000rpm) zentrifugieren¹².

¹¹Bei der folgenden Inkubation überleben auf Grund des Kanamycins nur mit M13KO7 infizierte Zellen. Durch den Glucoseentzug wird auf den Phagemids das Gen für das Fusionsprotein aus scFv und pIII aktiv.

- Die gereinigte Phagenlösung wird in neue Eppendorfgefäße überführt und bei 4°C oder -20°C gelagert.

Mit diesem Schritt ist eine Screening Runde abgeschlossen. Die Phagen können in der nächsten Runde fürs „panning“ eingesetzt werden.

Antibiotika- und Glucosekonzentrationen:

Ampicillin:	50µg/ml Medium
Kanamycin:	50µg/ml Medium
Tetracyclin:	30µg/ml Medium

Glucose 100 mM (50µl/ml Medium einer 2 M Glucosestocklösung)

5.4.6 Screening einer Phagemidbibliothek in ELISA-Platten mit Zellen als Antigen

Bei diesem Screeningverfahren werden eukaryontische adhärenente Zellen in einer ELISA-Platte (96 Vertiefungen) dicht herangezogen. Bei nicht adhärierenden Zellen muß die ELISA-Platte vorher mit Concanavalin beschichtet werden, um die Zellen besser an die Plastikoberfläche zu binden (Schmidt 1997). Die Platten werden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 100µl überschichtet. Bis zur Fixierung sind alle Schritte bei 4°C durchzuführen, um einen Verlust der Antigene durch abwerfen („shedding“) zu verhindern. Die Fixierung der Zellen erfolgt mit einer sehr geringen Konzentration an Glutaraldehyd. Die Fixierung verhindert ein Abscheren („shedding“) der Antigene und ermöglicht eine starke Bindung der Zellen an den Boden der ELISA-Platte. In jede Vertiefung der ELISA-Platte werden 100µl einer 0,01% igen Glutaraldehydlösung gegeben (Endkonzentration Glutaraldehyd pro Vertiefung 0,05%). Die Fixierung erfolgt über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Auch alle weiteren Inkubationschritte erfolgen in einer feuchten Kammer, um das Austrocknen der Reaktionsfläche zu verhindern. Nach der Fixierung können die Platten mehrere Tage bei 4°C gelagert werden oder für einen ELISA-Nachweis eingesetzt werden.

Beim Screening einer scFv-Antikörperbibliothek gegen Zelloberflächenantigene werden die fixierten Zellen als Antigen eingesetzt. Pro Vertiefung werden etwa 10^{11} bis 5×10^{11} Phagen eingesetzt. Sie werden in 4% Milchpulver in PBS verdünnt und für ca. 30 Minuten

¹²In diesem Schritt werden Kontaminationen entfernt, die mit PEG ausgefällt wurden, in PVP aber nicht löslich sind. Nach dieser Behandlung kann auf eine zweite PEG-Fällung verzichtet werden.

präinkubiert. Anschließend werden pro Vertiefung 100 µl der Phagensuspension zugegeben und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Danach wird die Platte 15x mit PBS/Tween und 5x mit PBS gewaschen. Zur Elution werden 100 µl Triethylamin (100 mM) pro Kavität zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Die Lösung wird durch Zugabe von 100 µl Tris/HCl (1M, pH7,5) neutralisiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und zu 5ml *E.coli* XL-1blue (OD₅₉₅ca. 0,4-0,6) gegeben, 30 min bei 37°C inkubieren.

Ein kleiner Teil der Zellen wird zur Titerbestimmung verdünnt und ausplattiert, der Rest auf SOB_{GA} Agarplatten. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 30°C.

Am nächsten Morgen werden die Kolonien mit einem gläsernen Drigalskispatel von den Platten abgelöst und in 10 ml 2xYT-Medium aufgenommen.

Mit dieser Kultur werden 50 ml 2xYT_{GA}-Medium angeimpft und die eluierte, angereicherte Bibliothek wie unter 5.4.5 beschrieben verpackt. Mit diesem Schritt ist eine Screening Runde abgeschlossen. Die Phagen können in der nächsten Runde eingesetzt werden.

5.4.7 ELISA

Der ELISA „enzyme linked immunosorbent assay“ ist u.a. eine Methode zur Bestimmung der Konzentrationen von Antigenen oder Antikörpern. Einer der miteinander reagierenden Antikörper ist dabei mit einem Enzym markiert (üblicherweise alkalische Phosphatase oder eine Peroxidase), die ein geeignetes Substrat in ein Produkt umsetzt, dessen Menge einfach kolorimetrisch quantifizierbar ist. Ein Antigen wird zunächst an einen festen Träger gebunden, durch Zugabe des ersten Antikörpers der spezifisch für das Antigen ist wird dieses markiert. Der Zweitantikörper ist an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt und gegen den Fc-Teil des Erstantikörpers gerichtet. Er dient dem kolorimetrischen Nachweis des Antigens. Die Zahl der verwendeten Antikörper liegt üblicherweise bei 2-4 Antikörpern.

- Vom Antigen werden in der Regel pro Kavität 1 µg in 100 µl PBS oder Carbonatpuffer aufgetragen.
- Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C.
- Jede Vertiefung 1x mit 200µl PBS waschen
- Zum Blocken der ELISA-Platte werden 200 µl Blocklösung pro Vertiefung zugegeben.
- Inkubation 1,5 h bei RT.
- Blocklösung dekantieren und die Platte 3x mit PBS waschen.

- Pro Vertiefung jeweils Zugabe von 100µl einer geeigneten Verdünnung des Ersten Antikörpers in Blocklösung.
- Inkubation 2 h bei RT.
- Platte 6x mit PBST waschen.
- Pro Vertiefung jeweils Zugabe von 100µl einer geeigneten Verdünnung des zweiten Antikörpers in Blocklösung. Sollte der Zweitantikörper nicht mit Peroxidase gekoppelt sein ist ein Dritter Antikörper zu verwenden gefolgt von einem Inkubation- und Waschschrift.
- Inkubation 2 h bei RT.
- Platte 6x mit PBST waschen.

Zugabe des Substrats TMB (**T**etramethyl**b**enzidin), durch dessen Umsetzung entsteht ein blauer Farbstoff. Die Intensität der Färbung wird bei 655nm nach 20-60min gemessen.

5.4.7.1 Phagen-ELISA

Eine Modifikation des allgemeinen Prinzips stellt der Phagen-ELISA dar. Dieser dient zum Nachweis der Bindung von Phagemidpartikel an ein Antigen. Zu diesem Zweck wird das Antigen an die Festphase¹³ (ELISA-Platte) gekoppelt, rekombinante Phagen mit entsprechender Spezifität binden an das präsentierte Antigen und werden mit einem geeigneten monoklonalen Antikörper gegen ein Phagenprotein nachgewiesen. Der Antikörper wird wiederum von dem zweiten, mit HRP gekoppelten Antikörper erkannt. Die Spezifität der Bindung kann durch Kompetitionen nachgewiesen werden. Hierzu werden der Phagenlösung entweder freies Antigen oder ein monoklonaler Antikörper gleicher Spezifität in steigenden Mengen zugesetzt.

Alle im folgenden beschriebenen Inkubationsschritte der Protokolle werden in einer feuchten Kammer durchgeführt, um Verdunstung der Lösungen zu vermeiden.

- Vom Antigen werden in der Regel pro Kavität 1 µg¹⁴ in 100 µl PBS oder Carbonatpuffer aufgetragen.
- Inkubation über Nacht 4°C.

¹³Die verwendeten ELISA-Platten bestehen aus Polyvinylchlorid (PVC).

¹⁴Die optimale Menge ist von dem verwendeten Antigen abhängig

- Jede Kavität einmal mit 200µl PBS waschen
- Zum Blocken der ELISA-Platte werden pro Kavität 200 µl Blocklösung zugegeben.
- Inkubation 1,5 h bei RT.
- Blocklösung dekantieren und die Platte 3x mit PBS waschen.
- Zugabe von 100 µl/Kavität Phagenlösung die 10^7 - 10^{10} Phagenpartikel enthalten soll¹⁵.
- Inkubation 2 h bei RT.
- Phagenlösung erneut dekantieren und Platte 6x mit PBST waschen. Zugabe einer geeigneten Verdünnung des Erst-Antikörpers (erkennt M13 Proteine) in Blocklösung.
- Inkubation 2 h bei RT.
- Platte 6x mit PBST waschen.
- Zugabe von 100 µl/Kavität einer geeigneten Verdünnung des Zweitantikörpers der an HRP gekoppelt ist, in Blocklösung.
- Inkubation 2h, RT.
- 6x mit PBST waschen.
- Zugabe des Substrats TMB, durch dessen Umsetzung entsteht ein blauer Farbstoff.

Die Intensität der Färbung entspricht der Menge des gebundenen Phagen und wird bei 655nm nach 20-60min gemessen.

5.4.7.2 ECL-Phagen-ELISA

Bei einem ECL-ELISA (*enhanced chemiluminescence enzyme linked immunosorbent assay*) handelt es sich um ein sehr sensitives Verfahren zur Detektion von Antigen-Antikörperbindungen. Das Prinzip ist das gleiche wie bei einem herkömmlichen ELISA, das Antigen wird mit einem Antikörper markiert, gegen den ein zweiter Antikörper gerichtet ist, der mit einer Peroxidase (z.B. Meerrettischperoxidase) markiert ist. Im Unterschied zu einem normalen ELISA wird der Gehalt an Antigen, mittels einer chemischen Reaktion durch Lichtemission gemessen. Hierbei wird Luminol in Anwesenheit von Phenolen durch HRP oxidiert, in der Folge kommt es zur Emission von kurzwelligem Licht. Das Emissionsmaximum liegt bei 425nm. Nach 20-30 min Minuten wird das Signal allmählich schwächer. Die Detektion erfolgt entweder mit einem Luminometer bei 425nm oder durch auflegen und kurze Belichtung (1-10min) eines in kurzen Wellenlängen sensitiven Photopapiers.

¹⁵Hierbei kann es sich direkt um Kulturüberstände oder um in Blockpuffer verdünnte PEG-Fällungen handeln. Entscheidend ist, daß die Zahl der Phagen groß genug ist, um später ein Signal zu geben.

Mit einem ECL-Phagen-ELISA können selbst geringste Mengen Antigen nachgewiesen werden, beziehungsweise schwache Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen detektiert werden.

Das Protokoll ist das gleiche wie bei einem normalen ELISA, allerdings müssen die Antikörperversünnungen sehr sorgfältig getestet werden, damit die unspezifischen Signale nicht zu stark werden. Außerdem muß bei einem ECL-Phagen-ELISA eine spezielle undurchsichtige ELISA Platte verwendet werden. Im vorliegenden Fall wurden Fluro Nunc Module, schwarz, MaxiSorp, der Firma Nunc GmbH, Wiesbaden verwendet. Das verwendete Chemolumineszenz Substrat war SuperSignal®(Firma Pierce, Rockford).

5.4.8 Plattenscreen

Auf einer LB-Agarplatte mit Glucose und den entsprechenden Selektionsmarkern die Klone ausplattieren.

- Inkubation bei 30°C ÜN.
- Auf die Kulturplatte mit den noch sehr kleinen Kolonien wird ein Nitrozellulosefilter (Schleicher & Schuell) blasenfrei aufgelegt.
- Die Lage des Filters durch mehrere unregelmäßige Einstiche in der Nähe des Randes, mit einer in Tusche getauchten Nadel markieren, um später positive Klone auf der Stammpalte identifizieren zu können.
- Den Filter wird, sobald er vollständig angefeuchtet ist mit einer Pinzette abgehoben. Dabei wird ein Teil der Zellen von der Platte auf den Filter übertragen.
- Eine Ecke (ca. 1/5 der Fläche) für eine Negativkontrolle mit einem Skalpell abschneiden und mit den Kolonien nach oben auf eine LB_{GAT}-Agarplatte blasenfrei legen.
- Der Rest des Filters wird auf eine LB_{GAT}-Agarplatte mit 100 µM IPTG als Induktor gelegt¹⁶.
- Inkubation 3 Stunden bei 37°C. Die Stammpalte wird ebenfalls bei 37°C inkubiert, bis die Kolonien nachgewachsen sind und dann bei 4°C gelagert.

¹⁶Das Gen für den scFv Antikörper wird dadurch induziert. Ein Induktor wie IPTG heftet sich an den Lac-Repressor, der dadurch seine Bindungseigenschaften ändert und von der DNA abfällt, wodurch das Gen für die Transkription freigegeben wird.

- Den Filter 15 Minuten bei RT mit den Kolonien nach oben unter dem Abzug mit Chloroform bedampfen. Hierzu werden die Filter in eine geschlossene Glasschale gelegt, in der ein Gefäß mit 5ml Chloroform steht. Auf diese Weise werden die Bakterien lysiert.
- Die Filter 3x je 10 Minuten auf dem Kippschüttler in jeweils etwa 50ml TNT-Puffer waschen.
- Die Filter werden wie ein Western Blot Filter weiterbehandelt, beginnend mit der Absättigung der Membran.

Die gefärbten Kolonien werden auf der Stammpalte identifiziert und ggf. weiterkultiviert.

5.5 Proteinchemische Methoden

5.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (*modifiziert nach Laemmli (Laemmli 1970)*)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wird hauptsächlich zum Auftrennen von Proteinen benutzt. Bei einer SDS-PAGE, erfolgt die Auftrennung der Proteine im Gegensatz zur nativen PAGE ausschließlich nach ihrer relativen Molekülmasse. SDS(Sodiumdodecylsulfat) bindet an das Protein und denaturiert es zusammen mit β -Mercaptoethanol das die Disulfidbrücken spaltet. Außerdem sorgt SDS für eine proportionale Ladungsverteilung im Vergleich zur Molekülmasse.

Die SDS-PAGE wird i.d.R. als *Disk-Gelelektrophorese* durchgeführt. Bei einer Disk-Elektrophorese besteht das Gel aus einem Trenn- und einem Sammelgel, wobei das Sammelgel grobporiger ist als das Trenngel. Beide Gele besitzen einen unterschiedlichen pH-Wert (Trenngel pH 8,8, Sammelgel pH 6,8) und eine unterschiedliche Leitfähigkeit, daher der Name diskontinuierliche Gelelektrophorese. Bei pH 6,8 liegt das chemische Gleichgewicht zwischen ionischer und nicht ionischer Form der Glycin-Moleküle im Elektrodenpuffer vorwiegend auf der Seite der ungeladenen Form, sie besitzen somit eine schlechte Leitfähigkeit. Beim Anlegen einer Spannung wandern die Cl^- -Ionen aufgrund ihrer geringen Größe am schnellsten, Glycinmoleküle dagegen am langsamsten. Die SDS-Proteinkomplexe bewegen sich zwischen Chlorid-Ionen-Front und Glycin/Glycinat-Moleküle, dort herrscht ein Mangel an Ladungsträgern, der die Spannung ansteigen läßt, wodurch die SDS-Proteinkomplexe beschleunigt werden, bis sie die Chlorid-Ionen-Front erreichen, an der sie aufgrund der hohen Anzahl an Ladungsträgern und der daraus resultierenden Spannungsverminderung wieder gebremst werden. Dies führt zu einer scharfen SDS-

Material und Methoden

Proteinkomplexbande an der Grenze zur Chlorid-Ionen-Front. Bei Erreichen des Trenngels, werden die Glycin-Moleküle vollständig in die ionische Form des Glycinats überführt (erhöhter pH) und überholen die SDS-Proteinkomplexe, weshalb der Fokussierungseffekt verloren geht und die SDS-Proteinkomplexe entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Den Trenngelmix nach unten stehender Tabelle zusammenpipettieren (ausreichend für 2 Gele von je 90 x 70 x 0,75mm)¹⁷.

	PAA-Konzentration im Trenngel				
	16%	14%	12%	10%	8%
LA 4	1,12ml	1,12ml	1,12ml	1,12ml	1,12ml
LA 2	4,58ml	4,01ml	3,43ml	2,86ml	2,29ml
H ₂ O	3,51ml	4,08ml	4,66ml	5,23ml	5,8ml
APS ¹⁸	82µl	82µl	82µl	82µl	82µl
TEMED	2,3µl	2,3µl	2,3µl	2,3µl	2,3µl
Gesamtvol.:	~9,3ml	~9,3ml	~9,3ml	~9,3ml	~9,3ml

Direkt nach dem Gießen wird das Trenngel mit Wasser oder besser mit Tris-Puffer (pH 8,8) überschichtet.

Das Gel ist nach etwa 30 Minuten auspolymerisiert und das Wasser bzw. der Puffer kann abgegossen werden.

Der Sammelgelmix wird nach folgender Anleitung zusammenpipettiert (ausreichend für 2 Gele von je 90x70x0,75mm):

Die PAA-Konzentration im Sammelgel beträgt 5%

LA 1	2,0ml
LA 2	0,62ml
H ₂ O	1,38ml
APS	42µl
TEMED	3,4µl
Gesamtvol.:	~4,0ml

¹⁷Für die hier beschriebene Methode wurde das *Minigelprotein*-Gelsystem der Firma Biorad (München) eingesetzt. Der Zusammenbau der Kammer erfolgt wie vom Hersteller angegeben.

¹⁸Durch Zugabe von APS wird die radikalische Polymerisation der Geles gestartet

Gelmix mischen und sofort gießen und hinterher die Taschenkämme einsetzen. Das Sammelgel ist nach etwa 45 Minuten bei RT polymerisiert. Die Gele werden in eine Gelkammer eingespannt und die Kammer mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Die aufzutragenden Proben werden 1:1 mit SDS-Probenpuffer gemischt und 2min auf 95°C erhitzt. Pro Geltasche können 10 bis 15µl Probe in SDS-Puffer aufgetragen werden. Das Gel bei 1,5W pro Gel für 1-1,5 Stunden mit 1xLaufpuffer laufen lassen.

Als Marker für 12 bis 16% Gele wird der SDS-7-Marker benutzt (Sigma, Deisenhofen):

BSA	66 kd
Ovalbumin	45 kd
Glyceraldehyd 3 Phosphat Dehydrogenase	36 kd
Carbanhydrase	29 kd
Trypsinogen	24 kd
Trypsin-inhibitor	20 kd
α-Lactalbumin	14,2 kd

Als Marker für 8 bis 12% Gele wird der SDS-6H-Marker benutzt, (Sigma, Deisenhofen):

Myosin	235 kd
β-Galaktosidase	116 kd
Phosphorylase	97,4 kd
BSA	66 kd
Ovalbumin	45 kd
Glyceraldehyd 3Phosphat Dehydrogenase	36 kd
Carbanhydrase	29 kd

5.5.2 Westernblot (*modifiziert nach Towbin et al. (Towbin, Staehelin et al. 1979)*)

Für die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde das *Minigelpotean*-Gelsystem der Firma Biorad (München) eingesetzt. Der Zusammenbau der Kammer erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

- Das Polyacrylamidgel wird zwischen je zwei Lagen Blottingpapier, die mit Blottingpuffer getränkt wurden, auf eine Nitrozellulosemembran gelegt und 1 h bei 320mA und 4W im Trockenblot geblottet.

- Die Filter werden zur reversiblen Färbung der Proteine etwa 10 Sekunden in Ponceau S-Lösung geschüttelt.
- Die Ponceau S-Lösung abgießen ¹⁹und überschüssiges Ponceau S durch 3 bis 4 maliges spülen mit Wasser entfernen.
- Die Markerbanden und die einzelnen Spuren werden mit einem Kugelschreiber markiert. Überflüssige Nitrozellulose wird mit einem Skalpell abgetrennt und die gefärbte Nitrozellulose photokopiert.

Immunfärbung der Proteinbanden:

- Die Nitrozellulose mit den Proteinen nach oben in ein möglichst kleines Plastikschälchen legen.
- Zum Abblocken der unspezifischen Bindungsstellen der Nitrozellulose werden 5 ml 2% Milchpulver zugeben.
- 30 Minuten bei RT auf einem Kippschüttler inkubieren.
- Blocklösung abgießen.
- In 5 ml Blockpuffer verdünnten Ersten Antikörper zugeben und 2 Stunden bei RT oder ÜN bei 4°C auf dem Kippschüttler inkubieren.
- Nitrozellulose 3x in 1xTNT in einer größeren Plastischale 10min waschen.
- In 5ml Blockpuffer verdünnten zweiten Antikörper zugeben.
- 2 Stunden bei RT oder ÜN bei 4°C auf dem Kippschüttler inkubieren.
- Nitrozellulose 2x in 1xTNT in einer größeren Plastischale 10min waschen.
- Nitrozellulose 1x in 1xTBS zum equilibrieren 10min waschen.
- In einer kleinen Plastischale mit etwa 10ml DAB-Substratlösung inkubieren. Für eine noch höhere Empfindlichkeit der Reaktion kann der Substratlösung 0,02% (v/v) CoCl₂ zugefügt werden.
- Wenn die Banden erscheinen²⁰, wird die DAB-Substratlösung abgegossen und die Reaktion durch mehrmaliges Waschen mit Wasser gestoppt.
- Die Nitrozellulose wird für weitere 15 Minuten in Wasser inkubiert, um ein Nachdunkeln zu verhindern.
- Die Nitrozellulose bei RT trocknen und eventuell photokopieren. Gefärbter Nitrozellulosefilter vor Licht geschützt aufbewahren.

¹⁹Die Lösung kann erneut verwendet werden

²⁰Nach maximal 15 min

5.5.3 Großaufreinigung von löslichen scFv-Fragmenten im pHOG-Vektorsystem

Es werden 10 ml LB_{GA} Medium mit *E.coli* XL1-Blue Bakterien, die mit dem scFv-Expressionsplasmid pHOG21 transformiert sind, angeimpft und bei 37°C und 280rpm über Nacht inkubiert.

Mit der gesamten Übernachtskultur wird am folgenden Tag 1l 2xYT_{GA}Medium angeimpft und die Kultur bei 37°C und 150rpm bis zu einer OD₅₉₅ von 0,6-0,8 geschüttelt. Ist dieser OD-Wert erreicht, werden die Zellen abzentrifugiert (3000g/ 1 min/ 20°C), in frischem Medium 2xYT_{SA} (Saccharose und Ampicillin) aufgenommen und die Antikörperproduktion durch IPTG Zugabe (Endkonzentration 0,1 mM) induziert. Man läßt die Kultur dann für 12 Stunden bei 18°C-22°C und 150rpm schütteln.

5 ml der Kultur werden nicht induziert (keine Zugabe von IPTG und kein Glucoseentzug), sie dienen später als Negativkontrolle, werden aber unter den gleichen Bedingungen wie die Hauptmenge weiterinkubiert.

Nach der Inkubationszeit werden die Bakterien abzentrifugiert (5000g/ 1min/ 4°C), der Überstand bei 4°C gelagert und das Pellet in 100ml eiskaltem PPP-Puffer aufgenommen und 1 Stunde unter gelegentlichem leichtem Schütteln auf Eis inkubiert. Im Anschluß wird die Suspension 30min bei 4°C und 10000g zentrifugiert. Dabei gelangen die löslichen scFv-Antikörper in den Überstand, während die aggregierten periplasmatischen scFvs und die Sphäroblasten im Pellet zurückbleiben.

Der Kulturüberstand und die Periplasmapräparation werden nun vereinigt und durch einen erneuten Zentrifugationsschritt (10000g/ 40min/ 4°C) weiter gereinigt. Mit Hilfe einer Amicon Konzentriereinheit (Amicon Witten, YM10 Filter) wird das Volumen auf 1/10 des Ausgangsvolumens einkonzentriert und über Nacht gegen Säulen-Puffer dialysiert. Die weitere Aufreinigung erfolgt über IMAC.

5.5.4 Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (IMAC) zur Aufreinigung und Konzentrierung der löslichen scFv-Antikörper aus PPP

Von einer mit Nickel (0,1M) oder Kupfer (0,1M) beladenen Sepharose (Qiagen) werden 5ml in eine Säule (Pharmacia) pipettiert. Wenn sich die Sepharose abgesetzt hat, wird die Säule mit 50 ml Equilibrierungspuffer equilibriert und die Säule mit PPP beladen. Zum Entfernen von unspezifisch gebundenen Proteinen wird erst mit 200 ml Equilibrierungspuffer und dann

mit 250ml Säulenwaschpuffer gewaschen. Die Elution des Antikörpers erfolgt mit 20 ml Elutionpuffer (250mM Imidazol), wobei jeweils Fraktionen von 1,5 ml aufgefangen werden. Die Einzelfraktionen werden im Western-Blot und auf einem Coomassie-Gel auf ihren Antikörpergehalt und auf Verunreinigungen untersucht. Fraktionen mit hohem Antikörpergehalt und wenigen Verunreinigungen werden vereinigt und gegen PBS dialysiert. Bei Bedarf kann zur Konzentrationserhöhung mit Hilfe von Ultrafree- 15 Konzentriereinheiten (Millipore) einkonzentriert werden.

Zellbiologische Methoden

5.5.5 Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität

10 µl der Zellsuspension werde 1 zu 1 mit Trypanblau (Sigma, München) gemischt und in einer Neubauer-Zellkammer ausgezählt. Tote Zellen nehmen das Trypanblau auf und färben sich blau, während lebende Zellen hell erscheinen. So läßt sich der Prozentuale Anteil an toten Zellen ermitteln.

5.5.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um eukaryontische Zellen zu kryokonservieren werden sie für 10 min bei 1200rpm und 4°C abzentrifugiert. Dann in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen überführt. Die Zellen werden langsam innerhalb von Stunden auf -80°C abgekühlt und danach in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von -196°C gelagert.

Zum Auftauen werden die eingefrorenen Zellen im Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut und mit mindestens dem zehnfachen Volumen an frischem Medium verdünnt. Nach einer Zentrifugation bei 4°C und 1200rpm für 5 min wird der Überstand verworfen und die Zellen in frischem Medium kultiviert.

Um die Einflüsse von dem DMSO²¹ und der Temperaturschwankung abzuschwächen, werden die aufgetauten Zellen erst nach 5-7 Tagen für Experimente verwendet.

5.5.7 Durchflußzytometrie (FACScan-Analyse)

Die Durchflußzytometrie ist ein Verfahren zur Zählung und Charakterisierung von Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom, in den meisten Fällen von Zellen in einer Suspension. Grundsätzlich können alle Merkmale eines Partikels, die sich über Lichtbeugung, Lichtstreuung oder Fluoreszenz charakterisieren lassen, zur durchflußzytometrischen Analyse herangezogen werden. Der FACScan (Fluoreszenz-aktivierter Zell Scanner) analysiert mehrere Parameter gleichzeitig. Die Zellsuspension wird vom FACScan eingesogen und die

²¹ Vorsicht beim Umgang mit DMSO, da es ein hervorragender Carrier für die unterschiedlichsten Substanzen durch Zellmembranen ist.

Zellen mittels hydrodynamischer Fokussierung einzeln an einem scharf fokussierten Laserstrahl vorbei geführt. Das Ausmaß der Beugung des Laserlichts durch die einzelne Zelle wird im Vorwärtslichtdetektor (Forward Scatter, FSC) gemessen und korreliert mit der Zellgröße. Das Ausmaß der Lichtstreuung wird mit dem Seitenlichtdetektor (Side Scatter, SSC) erfaßt und korreliert mit der Granularität (Zahl intrazellulärer Vesikel und anderer lichtstreuender Einlagerungen) der Zelle. Beide Photodioden absorbieren Licht der Wellenlänge 488nm (blau).

Neben den Eigenschaften der Zellen, die einfach durch Messen der Streuung und Beugung von Licht, bestimmt werden können, lassen sich die Expression von Antigenen auf der Zelloberfläche oder die Funktionalität rekombinanter Antikörper testen.

Hierzu verwendet man Primär- oder Sekundärantikörper, die mit Fluoreszenzmolekülen gekoppelt sind. Diese absorbieren Laserlicht und emittieren daraufhin Photonen definierter Wellenlänge. Als Farbstoffe werden in der Regel FITC (Fluorisoithiocyanat, 530nm, grün), PE (Phycoerythrin, 585nm, orange) und Texas-Red 670 (670nm, rot) verwendet. Das Emissionsgemisch wird in der optischen Bank mit Hilfe von Filtern, die nur Licht bestimmter Wellenlänge passieren lassen (Bandpassfilter) getrennt auf die drei jeweiligen Detektoren (grün, orange, dunkelrot) gelenkt. Diese wandeln Lichtimpulse in elektrische Impulse um und verstärken das Signal (Photolichtverstärkerröhre). Diese Signale werden über einen Analog-Digital-Wandler zum Computer weitergeleitet. Dabei findet eine Klassifizierung der Impulshöhen (Fluoreszenzintensität) statt, die von der Zahl der Fluoreszenzmoleküle pro Zelle abhängt. Die Intensitätsverteilung mehrerer tausend Zellen wird letztendlich in einem Histogramm dargestellt. Neben diesen reinen Analysengeräten gibt es zusätzlich noch sogenannte FACSSorter. Dabei werden die gemessenen Zellen nicht verworfen, sondern mechanisch oder elektrostatisch in ein Gefäß sortiert. Die Parameter nach denen die Zellen sortiert werden sind frei wählbar (Floureszenzfarbe, Größe oder Granularität).

Vorbereitung der Zellen zur FACScan-Analyse:

- 10^5 - 10^6 Zellen werden bei 4°C und 1000g (Heraeus-Megafuge, Rotor 3360 1200rpm) für 10min zentrifugiert.
- Die Zellen werden in 100 µl Erstantikörperlösung resuspendiert und auf Eis bei 4°C für 30min inkubiert.

- Bei der Negativkontrolle die Zellen statt mit der ersten Antikörperlösung mit PBS inkubiert. Sind mehr als zwei Antikörper zur Färbung nötig z.B. weil kein FITC markierter Zweitantikörper zur Verfügung steht, kommt eine dritte Antikörperlösung hinzu. Es empfiehlt sich die Antikörper vor der Verwendung einmal auszutitrieren und die optimal Verdünnung zu ermitteln.

Erstantikörperlösung:

PPP unverdünnt,
aufgereinigte monoklonale Antikörper meist
1:100 in PBS verdünnt

Zweitantikörperlösung:

Ziege anti-Maus AK-FITC
1:100 in PBS

VI Ergebnisse

6.1 Screening einer aus 50 Spendern klonierten $4 \cdot 10^9$ Phagedisplay Bibliothek gegen Oberflächenantigene.

Nach Fertigstellung einer großen Phagenbibliothek, die aus den peripheren Blutlymphozyten von fünfzig Spendern kloniert wurde und ersten erfolgversprechenden Screeningversuchen gegen Haptene sollte diese Bibliothek von mir gegen Oberflächenantigene getestet werden.

Hierzu wurde die kurz zuvor im Labor entwickelte Methode des „whole cell screenings“ mit ELISA-Platten eingesetzt (Schmidt 1997; Schmidt, Braunagel et al. 1999).

Dafür wurde eine mit dem Oberflächenantigen CD20 transformierte Mausfibroblasten-L-Zelllinie verwendet, sowie eine Mausmammarkarzinom-Zelllinie (DA3) die mit dem EGP2 Antigen transformiert worden war (künftig als Egp2 bezeichnet). Um unspezifisch bindende Phagen zu entfernen, wurden Mausfibroblasten-L-Zelllinien eingesetzt, die irrelevante Antigene präsentieren bzw. die Ausgangszelllinie DA3. Die Anzahl der eluierten Phagen, beim Einsatz der 50 Spenderbibliothek, betrug bereits in der ersten Runde 10^{7-8} . Gegen so einen hohen Anteil an „unspezifisch“ binden Phagen ist keine Anreicherung möglich, da die pro Runde erhaltenen Phagen mit 10^{7-8} nur um etwa den Faktor 100-1000 unter der eingesetzten Phagenmenge liegt. Das bedeutet, daß mehr Phagen an der Oberfläche hängen bleiben, als spezifisch zu erwarten wäre. Geht man von 10^{0-3} spezifisch bindenden Phagen aus, so kann es keine Anreicherung gegen diesen Hintergrund an unspezifisch bindenden Phagen geben. Daneben liegt die maximal zu erhaltende Anzahl an Klonen auf einer 22*22cm großen Agaroseplatte bei 10^{7-8} .

Um den Elutionstitern zu verringern wurde eine Reihe von Änderungen im Protokoll ausprobiert. Ausprobiert wurden z. B. unterschiedliche Blockierungssubstanzen (Milchpulver, PierceSuperblock, BSA in Milchpulver), unterschiedliche Präadsorptionsprozeduren und Inkubationszeiten auf den untransformierten Zelllinien. Auch eine Verringerung der eingesetzten Phagenmenge in der ersten Runde von 10^{11} auf 10^{10} brachte nicht den gewünschten Erfolg. 10^{10} Phagen ist auch gleichzeitig die unterste Grenze, da bei einer weiteren Reduktion der eingesetzten Phagen die Gesamtkomplexität der Bibliothek nicht mehr vorhanden ist.

Die Methode erwies sich im Falle der Fünfzig Spender Bibliothek, wegen des hohen Anteils an unspezifisch bindenden Phagen, als nicht geeignet um spezifische „single chain“ Antikörper über mehrere Runden anzureichern.

Eine andere Möglichkeit Phagen zu selektieren die Oberflächenantigene spezifisch binden, verwendet eine Zellsorter (FACSTARPlus, Becton Dickinson)

Hierbei werden Zellen mit Hilfe eines Zellsorters zusammen mit den an die Oberfläche gebundenen spezifischen oder unspezifischen Phagen sortiert. Die zu sortierenden Zellen werden mit monoklonalen Antikörpern angefärbt und entweder positive oder negative Zellen sortiert. Nach dem Sortieren einer bestimmten Anzahl von Zellen (10^4) werden die Phagen von diesen eluiert und Bakterien mit dem Eluat infiziert. Durch Wiederholen dieser Prozedur, kommt es zu einer Anreicherung von Subpopulations spezifischen Antikörpern gegen periphere Blutlymphozyten. (de Kruif, Terstappen et al. 1995). Der Vorteil einer solchen Methode ist, daß das Antigen in seiner nativen Form vorliegt und die Zellen nicht fixiert werden müssen.

6.1.1 Screening der fünfzig Spenderbibliothek unter Verwendung eines FACSsorter

Zum Screening wurde zunächst ein Hochleistungs-FACSsorter (Becton Dickinson) verwendet, der die Zellen durch elektrostatische Aufladung des Transportstromes sortiert. Hierzu wird eine Spannung an die Transportflüssigkeit angelegt und die zu sortierenden Zellen zwischen zwei Elektroden in zwei Röhrchen abgelenkt.

In diesen Versuchen wurden wieder die bereits zum Platten-Screening verwendeten, oben erwähnten L-Zelllinien, sowie die Mausmammarkarzinom Zelllinie EGP2 und die untransfizierte Variante DA3 verwendet. Die Egp2-, und die CD20-Transfektante waren von besonderem Interesse, da es sich hierbei um Tunorantigene handelt. Als Ausgangsmaterial für ein Screening wurde eine Mischung aus präsentierender und nicht präsentierender Zelllinie im Verhältnis 10/1 verwendet.

Nach dem Sortieren von 10^4 Zellen, gefolgt von der anschließenden Elution der darauf gebundenen Phagen und anschließender Reinfektion von Bakterien, wurden in den einzelnen Versuchen Phagentiter von 500-3000 pro Ansatz erhalten. Die in den Versuchen erhaltenen Titer, entsprachen denen, die in der Literatur veröffentlicht sind. Bei diesen Versuchen wurden svFv-Fragmente gegen Antigene auf peripheren Blutlymphzyten selektioniert (de Kruif, Terstappen et al. 1995).

Die Screeningversuche gestalteten sich jedoch problematisch, da sich die Phagemide der reinfizierten Bakterien bereits in der ersten Runde in fast allen Fällen nicht mehr verpacken ließen und somit eine zweite Anreicherungsrunde nicht durchgeführt werden konnte; der Grund hierfür wird später erläutert.

Trotzdem wurden von den jeweiligen ersten Runden Klone gepickt und auf Bindung analysiert. Hierzu wurde das normale ELISA-System mit TMB (Tetramethylbenzidin) als Substrat benutzt 5.4.7.1. Dies erwies sich als zu schwach, um zuverlässig Bindung von spezifischen Phagen an die Zelloberflächenantigene nachzuweisen.

6.2 Etablieren eines ECL-ELISA-Systems für die ultrasensitive immunologische Detektion von Oberflächenantigenen im Phagen-ELISA

Da unser bestehendes ELISA-System zu unempfindlich war um geringe Mengen an Antigen bzw. schwache Antikörper-Antigen Wechselwirkungen zu detektieren, wurde ein neues sensitiveres ELISA-System auf Chemolumineszenz Basis entwickelt. Bei diesem System wird eine spezielle, schwarze, undurchsichtige ELISA-Platte verwendet, um die Ausbreitung der Lichtsignale nur nach oben zu ermöglichen 5.4.7.2.

Zum Austesten der richtigen Mengen des ersten und vor allem des zweiten Antikörpers wurde ein Test-ELISA entwickelt (Abbildung 5).

Hierzu wurde eine ELISA-Platte mit PhOx-BSA als Antigen beschichtet und Phagen die einen anti-PhOx-scFv Antikörper präsentieren zur Detektion des Antigens eingesetzt. Pro Kavität wurden 1µg PhOx-BSA als Antigen eingesetzt und die gesamte Platte damit über Nacht beschicht. Kavität G12 und H12 blieben unbeschichtet und dienten als Negativkontrolle. Die PhOx-Phagen wurden in 10er Schritten, beginnend mit 10^{10} verdünnt. Pro Verdünnung wurden Doppelproben aufgetragen. Die zweite Spalte endet mit der 10^3 Verdünnung des Detektionsantikörpers. Der Erstantikörper (FE2 Pharmacia), der gegen das pVIII Phagenprotein gerichtet ist, wurde in hoher Konzentration (1:500) eingesetzt, um mögliche unspezifische Bindung nachweisen zu können. Der mit Meerrettichperoxidase gekoppelte Detektionsantikörper (Ziege anti Maus) wurde in folgenden Verdünnungen ausgetestet: Beginnend mit Spalte 1 und 2; 1:2000, 1:5000, 1:10000, 1:20000. In Spalte 9+10 wurde nur der erste Antikörper und in Spalte 11 und 12a-f der erste und der zweite Antikörper verwendet. Das verwendete Chemolumineszenz Substrat war SuperSignal®(Firma Pierce, Rockford). Das Emissionsmaximum liegt bei 425nm. Die Auswertung erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms in einer Dunkelkammer.

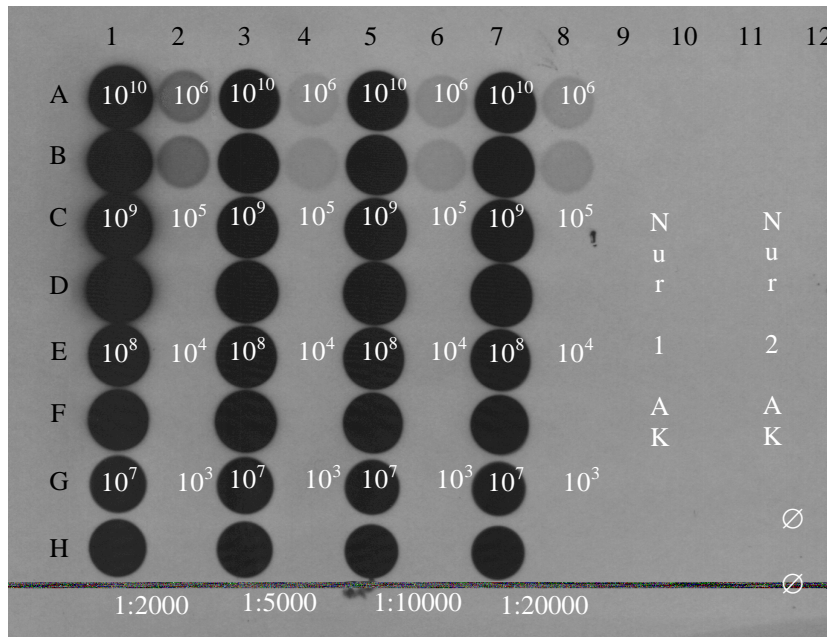


Abbildung 5: ECL-ELISA mit PhOx-BSA und rekombinaten scFv Phagen gegen PhOx zum Austesten der Empfindlichkeit des ELISA-Systems in Abhängigkeit von der Antikörper Konzentration. Spalte 1+2; 1:2000, 3+4 1:5000, 5+6 1:10000, 7+8 1:20000. In Spalte 9+10 wurde nur der erste Antikörper und in Spalte 11+12a-f der erste und der zweite Antikörper verwendet. In Spalte 12 g+h ist die Negativkontrolle, die Vertiefungen wurden nicht mit PhOx-BSA beschichtet. Der Röntgenfilm wurde ca. 5 min aufgelegt.

Die Detektionsgenze mit einem ECL-Phagen-ELISA liegt in diesem Fall um das 100-1000fache höher als mit einem normalen Phagen-ELISA der TMB als Substrat verwendet. 10^5 Phagen wurden gerade noch bei der 1:2000 Verdünnung des zweiten Antikörpers erkannt. Die 10^6 Phagen wurde unabhängig von der Konzentration des Zweitantikörpers in allen Verdünnungsstufen erkannt.

6.3 Analyse der im FACSSort erhaltenen Phagenklone mittels ECL-ELISA

Alle bislang isolierten Klone wurden mit diesem ECL-ELISA getestet. Dafür wurden die zum Screening verwendeten transformierten L-Zelllinien CD20, CD23, CD40, sowie die mit EGP 2 transformierte Maus-Mamma-Karinom Zelllinie, anstelle auf einer normalen Kulturplatte auf einer speziellen, schwarzen, ELISA-Platte (Maxisorp, FluroNunc; Fa. Nunc, Wiesbaden) dicht herangezogen und dann in einem ECL-Phagen-ELISA als Antigen verwendet. Hierzu wurden je 96 Einzelklone verpackt und 100µl der Phagenüberstände in einem ECL-ELISA auf der jeweiligen transfizierten sowie auf den untransfizierten Zellen getestet.

Hierbei zeigten einige der Überstände Bindung an die transformierten Zelllinien. Exemplarisch soll dies am Beispiel der mit EGP 2 präsentierenden Zelllinie gezeigt werden. Für einen ELISA wurden jeweils zwei Platten präpariert, eine Platte als Negativkontrolle mit der Wildtypzelllinie, im Falle von Egp2 also DA3 und eine Platte mit der das Antigen präsentierenden Zelllinie, hier Egp2.

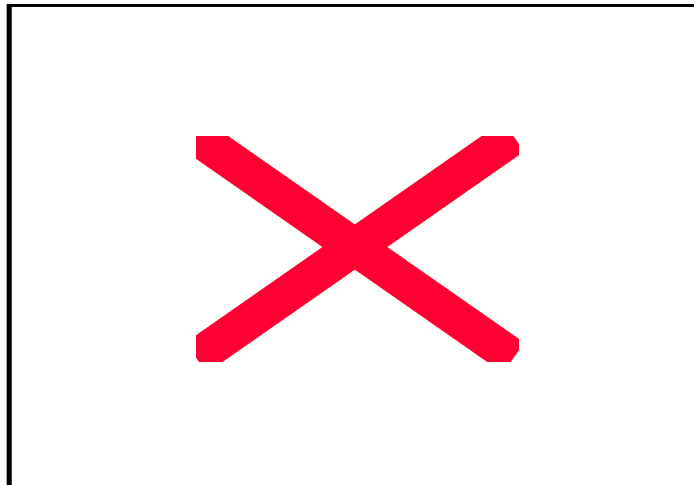
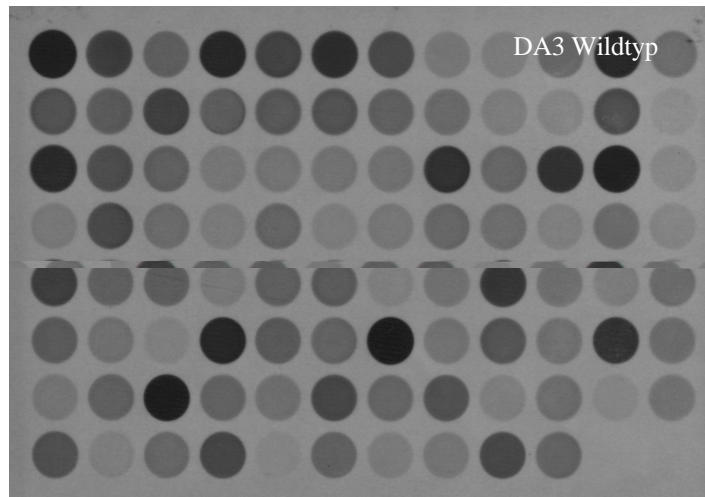


Abbildung 6: ECL-ELISA von 96 Phagenüberständen aus dem Screening auf Egp2 exprimierenden Zellen. Der ELISA wurde mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen pVIII (FE2; Pharmacia) 1/2000 und einem polyklonalem Ziege anti Maus Serum HRP Konjugat (Dianova) 1/5000, gefärbt. In den Vertiefungen H11+12 wurde das Antigen mit Hilfe eines monoklonalen Maus-Antikörpers (HEA 125, Dr.Moldenhauer; DKFZ) gegen Egp2 angefärbt. Die Belichtungszeit betrug 8min.

Die 13 Klone, die entsprechend der Schwärzung des Röntgenfilms am stärksten mit der EGP2 Transfektante reagierten, sowie 2 Klone, die mit der DA3 Zelllinie positiv reagierten, wurden weiter analysiert. Ebenso wurde mit den anderen Screeningansätzen verfahren (Daten nicht gezeigt).

Bereits beim Verpacken der 96 Einzelklone kam es zu Schwierigkeiten. Einzelne Klone lysierten während der Übernachtverpackung, während andere sich ganz normal verpacken ließen. Der Grund für diese Schwierigkeiten, sowie für die Probleme beim Verpacken der ersten Screeningrunden lag in einer Kontamination der fünfzig Spenderbibliothek mit mehreren Phagenarten, wie Plaquetests mit der Gesamtbibliothek bewiesen. Daraufhin wurde jede Subbibliothek eines Einzelspenders in Plaquetests auf Kontamination geprüft. Kontaminierte Subbibliotheken wurden aussortiert. Allerdings zeigte sich am Ende dieser Untersuchungen, daß es sich bei einem der Phagen um einen gentischsnisch veränderten Lambdaphagen handelt (Pers. Mitteilung Dr. Peter Röttgen).

Auch die Infektionsquelle in unserem Labor wurde gefunden. Ein Teil der M13 Helferphagen, mit denen die Bibliothek verpackt wurde, war mit Phagen kontaminiert, weshalb diese sich so stark ausgebreitet hatten. Da sich der Lambdaphage ins Genom integriert und sich bereits in den Subbibliotheken befindet, ist es unmöglich ihn, vollständig aus der fünfzig Spender Bibliothek zu entfernen.

Bei der Auswertung der Expressions- und Restriktionsanalysen traten jedoch weitere Problematiken auf. Dies soll wiederum am Screeningversuch mit dem EGP 2 Antigen gezeigt werden. Die Restriktionsanalysen der Einzelklone zeigten, daß beim ausschneiden der Klonierungskassette *NcoI/NotI*, daß ein Teil der Klone eine verkürzte Kassette enthielt und somit keine vollständigen „single chain“ Antikörper produzieren können (Spur 2, 5, 9, 10, 13).

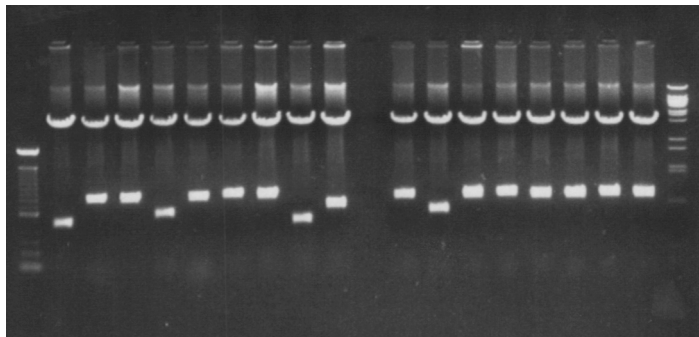


Abbildung 7: Agarosegelelektrophorese eines *NcoI/NotI* Restriktionsverdau von Einzelklonen, die zuvor in den Expressionsvektor pHOG21 kloniert wurden. Aufgetragen wurden je 5µl des Restriktionsansatzes (ca. 1µg DNA) Fünf der 17 Klone haben ein verkürztes Insert (Spur 2, 5, 9, 10, 13). Die normale Größe einer „singel

chain“ Kasette ist ca. 800bp, bei den fünf Klonen ist das Insert kleiner. Als Marker wurde der 100bp Marker und Lambda *Bst*EII verwendet.

Bei den Expressionsanalysen zeigte sich, daß der Anteil an im Westernblot bzw. Plattenscreen positiven Klonen weniger als fünfzig Prozent beträgt, was unter den Werten für die Gesamtbibliothek liegt (60-65%, Dissertation Petra Rohrbach).

Sequenzierungen ergaben, daß dieser hohe Anteil an nicht funktionellen Antikörper auf Probleme bei der Synthese der Oligonukleotide, die für diese Bibliothek benutzt wurden, zurückzuführen waren. Auf Grund eines Synthesefehlers bei diesen Primern kam es häufig zu Leserasterverschiebungen, die zu einem unvollständigen oder gar zu keinem scFv-Fragment führten.

Nachfolgende Tabelle gibt noch einmal eine Zusammenfassung der Daten für das EGP2-Screening. Die Ergebnisse für die Screeningversuche gegen CD20 sehen ähnlich aus, auf eine Darstellung wurde verzichtet.

Versuch	Klon	Plattenscreen		Western Blot	ECL-ELISA		Restriktions-verdau
		anti-PIII	anti-Yol	anti c-myc	EGP +	EGP -	<i>Nco</i> I/ <i>Not</i> I
039 Nr.3	B 2	++	++	-	+++	-	OK
039 Nr.3	C 2	-+	+	n/a	++	-	Zu kurz
039 Nr.3	C 10	-	-	-	+++	++	OK
039 Nr.3	E 2	+++	-	-	++	++	OK
039 Nr.3	B 10	n/a	n/a	-	++	+	OK
039 Nr.3	G 8	-	-	-	+++	+	OK
039 Nr.3	A 1	n/a	n/a	+++	+	+++	OK
039 Nr.3	A 11	n/a	n/a	+++	-	+++	OK
039 Nr.3	B 3	-+	+	-	+++	+	OK
039 Nr.3	D 2	+++	+++	+++	++	+	OK
039 Nr.3	E 3	-	-	n/a	++	-	n/a
039 Nr.3	F 1	-	+	-	+	-	n/a
039 Nr.3	F 2	+++	+++	+++	++	-	OK
039 Nr.3	F 9	++	+	-	++	+	OK
039 Nr.3	G 5	+	-	-	++	+	n/a

Tabelle 1: Übersicht über die Ergebnisse des Screenings gegen EGP 2. Beim Plattenscreen wurden die Klone zum einen mit einem monoklonalen Antikörper gegen pIII (1:8000) und zum anderen mit einem gegen das Yol Epitop im scFv gerichteten ersten Antikörper (1:500) gefärbt. Beim Westen Bot wurde der anti-c-myc Antikörper (1:3000) verwendet. Beim ECL-ELISA wurde FE2 (1:2500) eingesetzt. Als Detektionsantikörper wurde in allen Fällen Ziege anti Maus HRP Serum (1:3000) verwendet. (+++ = starkes Signal; ++ = mittleres Signal; + = wenig Signal; - = kein Signal; n/a = nicht ausgewertet)

Keiner der beiden in allen Untersuchungen letztlich positiven Klone (D2/F2) zeigt in einer FACS-Analyse eine positive Bindung an mit EGP 2 transformierte Zellen. Genauso verhielt es sich im Falle des CD20 Screenings.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde in der Arbeitsgruppe beschlossen eine neue Bibliothek mit neuen Primer und verbesserten Klonierungsstrategien zu erstellen 6.5. Bis zur Fertigstellung wurde die alte Bibliothek gegen aufgereinigte HBV-Antigene gescreent. Nach Fertigstellung der neuen Bibliothek wurden das FACS-Screening wieder aufgenommen 6.9.

6.4 Screening der fünfzig Spender Bibliothek gegen HBV-Antigene

Da das Screening mit Zellen vor der Fertigstellung der neuen Bibliothek wenig aussichtsreich war, wurde in der Zwischenzeit ein Screening gegen Hepatitis B Virus (HBV) Antigene durchgeführt. Diese Antigene sind als Tumormarker interessant und standen zudem in aufgereinigter bzw. rekombinanter Form zur Verfügung. Die Antigene wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Heinz Schaller, ZMBH Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um rekombinant hergestelltes preS1, preS1/2, sowie aufgereinigtes L Protein. Damit war es möglich, das etablierte stringente Screeningverfahren in Nunc Maxisorp Röhrchen durchzuführen.

Pro Antigen und Runde wurden 10^{11} Phagen eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Röhrchen, das nur mit Milchpulver (2% in PBS) beschichtet wurde. Hierdurch werden die unspezifischen Bindungen bzw. die Bindung der Phagen an das Blockmedium gemessen. Man erhält so einen Eindruck davon, ob die Anreicherung spezifisch ist und nicht gegen das Blockmedium gerichtet. Die Phagentiter werden nach jeder Runde bestimmt und sind ein Maß für die Anreicherung. Nach vier Selektionrunden konnte eine spezifische Anreicherung gegen zwei Antigene festgestellt werden. Die Titer für das Screening gegen das L-Antigen und das preS1 Protein lagen mit $>10^7$ bzw. $7 \cdot 10^5$ deutlich über dem Negativwert mit $1 \cdot 10^4$. Für preS1/2 wurde keine Anreicherung erzielt. Auch eine mehrmalige Wiederholung des Screenings gegen preS1/2 brachte keine Anreicherung (Phagentiter unter 10^4).

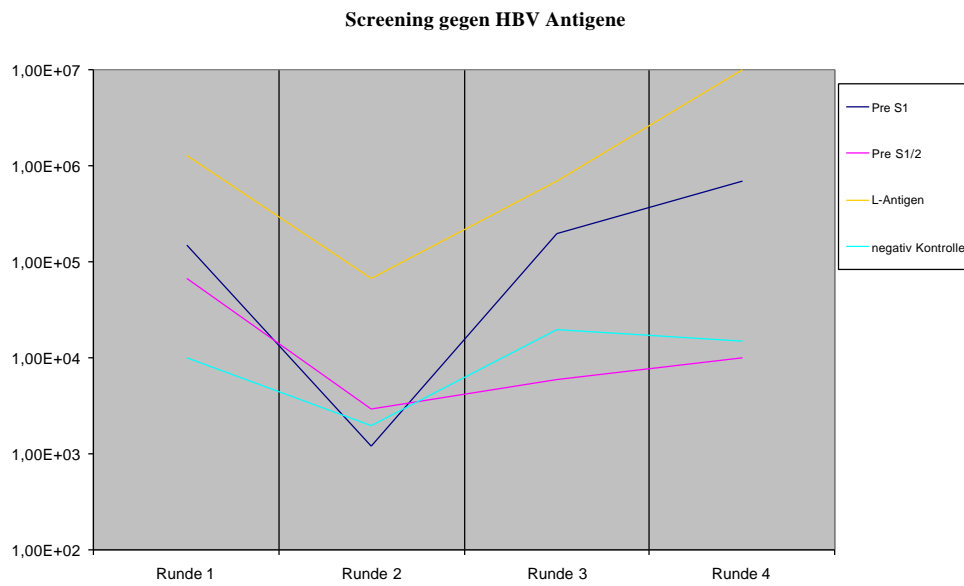


Abbildung 8: Phagentiter der einzelnen Selektionsrunden

Um direkt die scFv-Fragmente testen zu können, wurde die Phagemid-DNA aller drei Ansätze, als Klonmischung aus der angereicherten Bakterienpopulation isoliert und die scFv-Expresionskassette durch einen *NcoI/NotI* Restriktionsverdau aus dem Plasmid ausgeschnitten. Diese Kassette wurde dann zur Expression der scFv-Fragmente ohne das pIII Fusionsprotein in einen Expressionvektor pHOG21 kloniert 5.1.6.. Die dabei erhaltenen Klone wurden in einem Plattenscreen auf Expression getestet.

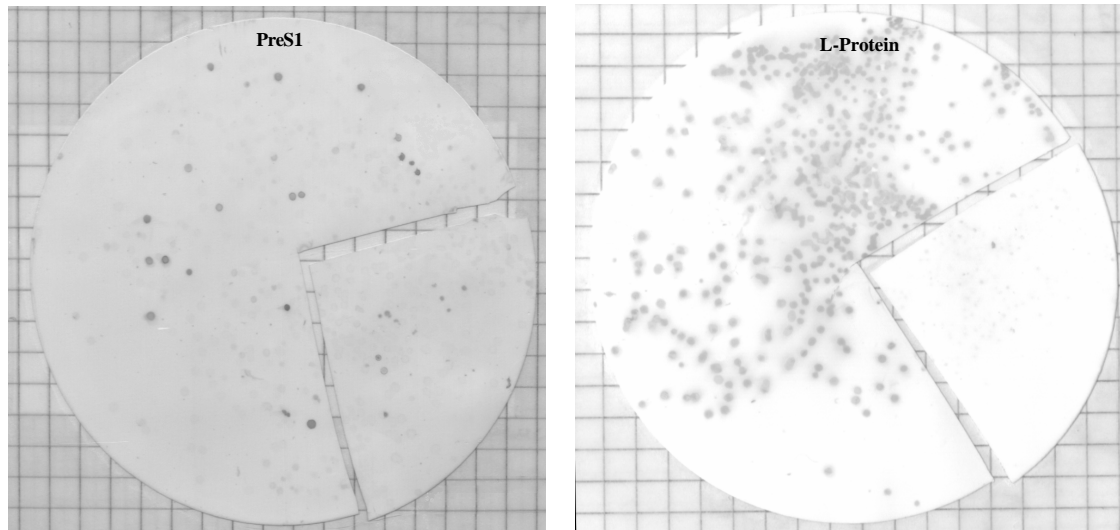


Abbildung 9: Plattenscreen der in pHOG21 umklonierten Klone. Die Koloniedichte war etwa gleich hoch. Das herausgeschnittene Viertel wurde nicht induziert und dient somit als Negativkontrolle. Schwache Färbungen sind normal, da sich der Expressionsvektor nicht zu 100% reprimieren läßt. Der linke Plattenscreen stammt vom preS1 Screening, der rechte vom Screening mit dem L-Protein. Der Vergleich der beiden Plattenscreens zeigte, daß im Falle des preS1 Antigen nur noch wenig funktionelle scFv produziert werden, im Gegensatz dazu sind alle erhaltenen Kolonien beim Screening mit dem HBV-L-Protein positiv. Die Plattenscreens wurden mit anti-c-myc Antikörper 1/2000 und Ziege-anti-Maus HRP 1/2000 gefärbt.

Bei den Plattenscreens zeigte sich, daß die Klone, die beim preS1/2 und beim preS1 Screening erhalten wurden, nur zu einem geringen Teil scFv-Fragmente produzieren. Im Falle des negativ verlaufenen preS1/2 Screenings wäre das noch zu erwarten gewesen, nicht aber beim preS1 Screening, wo alles auf eine erfolgreiche Anreicherung hindeutete. Lediglich im Falle des L-Protein Screenings scheinen alle Klone ein scFv-Protein zu exprimieren. Von allen Ansätzen wurden 95 im Plattenscreen positive Einzelklone gepickt und in einem Phagen-ELISA auf Bindung getestet.

Keiner der Klone aus dem oben dargestellten preS1 bzw. preS1/2 Screening, zeigte eine spezifische Bindung an das preS1 oder preS1/2 Antigen im Phagen-ELISA. Einige der 95 Einzelklone aus dem Screening mit dem L-Protein hingegen zeigten sehr gute Bindung im Phagen-ELISA. Die Bindungsdaten von 10 Klonen sind in nachfolgendem Diagramm dargestellt.

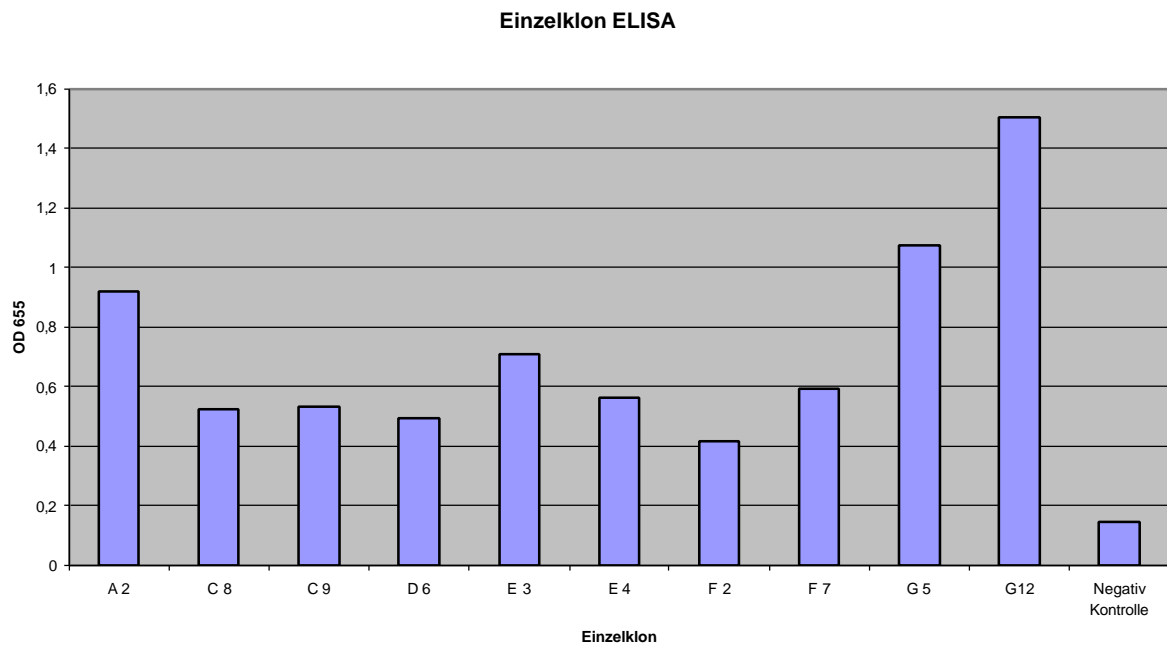


Abbildung 10: ELISA der angereicherten Klone aus dem Protein L-Screening. Die Signalstärke der Einzelklone variiert sehr stark. Als Substrat wurde hier TMB verwendet, gefärbt wurde mit anti c-myc-AK (1:3000) und Zeige Anti Maus HRP(1:2500).

Die zehn oben dargestellten Klone wurden in einem *BSTNI* Restriktionsverdau untersucht um festzustellen, ob die zehn Klone von einem Klon abstammen oder ob es sich um mehrere verschiedene Klone handelt. Das Restriktionsenzym *BSTNI* schneidet besonders häufig in Antikörpersequenzen (Tomlinson 1997).

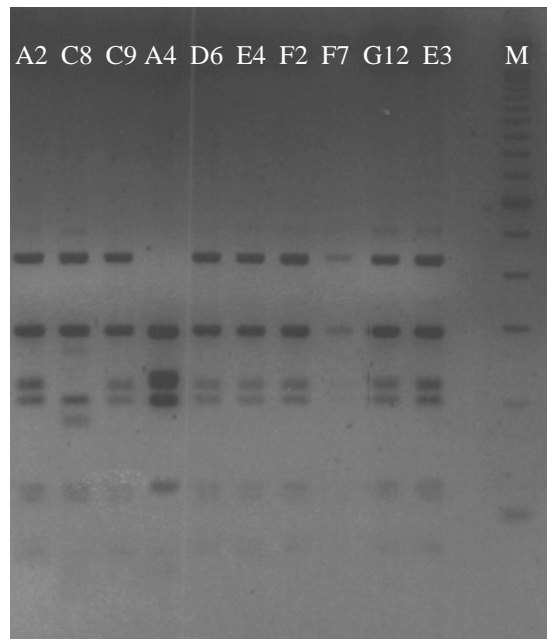


Abbildung 11: Agarosegelelektrophorese des *Bst*NI Restriktionsverdau von 11 Einzelklonen aus dem HBV-L-Protein Screening. Man kann drei unterschiedliche Restriktionsmuster erkennen: Spur 4 (Klon A4) ist eine Negativkontrolle der Klon zeigte keine Bindung im Phagen-ELISA; Spur2 ist der Klon C8; die übrigen Restriktionsmuster sind identisch und werden künftig C9 genannt.

Bei diesem Verdau wurde festgestellt, daß es sich um zwei voneinander unabhängigen Klone handelt. Dies wurde auch durch die Sequenzierung der betreffenden Klone bestätigt. Ein Klon war neumal vorhanden, künftig C9 genannt, der zweite Klon (C8) war nur einmal vorhanden. Bei der Sequenzierung wurde auch festgestellt, daß die Klone ursprünglich mit IgG spezifischen Primern amplifiziert wurden. Die Klone stammen also vermutlich von IgG-Antikörpern der Spender.

6.4.1 Aufreinigung der beiden identifizierten Klone

Die beiden scFv-Antikörper wurden durch Nickel-Chelat-Chromatographie mittels FPLC aufgereinigt. Hierzu wurde aus je einem Liter Induktionskultur (100µM IPTG), die scFv-Antikörper aus dem Periplasma und dem Medium isoliert. Die Periplasmapräparation und der einkonzentrierte Überstand wurden gegen PBS dialysiert. Das Periplasmadialysat wurde dann auf eine mit Nickel beladene „Fast Flow Chelating Sepharose“ geladen und mittels FPLC aufgereinigt. Die einzelnen Elutionsfraktionen wurden in einer 12%igen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Dabei wurden von verschiedenen Fraktionen (Volumen pro Fraktion: 1ml) 5µl in einer 1:2 Verdünnung mit SDS-Probenpuffer aufgetragen.

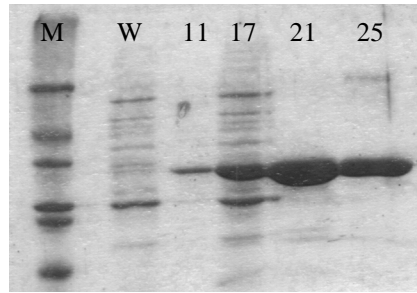


Abbildung 12: Coomassie gefärbte 12%ige SDS-Page der Aufreinigung von Klon C9. M=SDS7 Marker 5.5.1, W= Waschfraktion, 11, 17, 21 und 25 ausgewählte Eluatfraktionen, jeweils 1:1 in SDS-Probenpuffer.

Die Coomassie gefärbte SDS-PAGE zeigt, daß die einzelne Fraktionen große Mengen an scFv-Antikörper enthalten (Starke Bande bei 34kD) und nur geringe Kontaminationen aufweisen. Es sind insbesondere in den Fraktionen mit hohem Proteingehalt 21 und 25 nur wenig kontaminierendes Protein vorhanden, so daß man den scFv Proteingehalt photometrisch abschätzen kann.

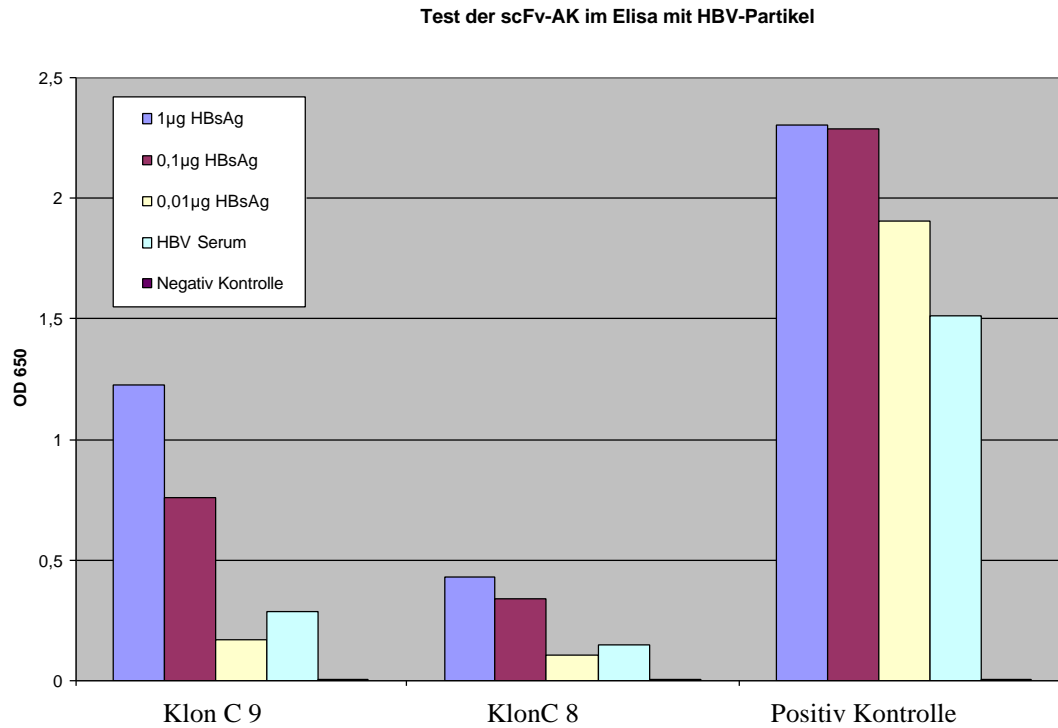
Die Fraktionen, die scFv-Antikörper enthielten, wurden vereinigt und der Gesamtproteingehalt wurde anschließend durch den Extinktionkoeffizient und nach Bradford bestimmt. Die Gesamtmenge an Protein in den vereinigten Fraktionen war mit ca. 25mg bei C9 und 17mg bei C8 sehr hoch. Aufgrund dieser hohen Ausbeuten wurde auf eine FPLC-Aufreinigung des Überstandes verzichtet, da genügend Protein für weitere Tests zur Verfügung stand.

6.4.2 Nachweis der Bindung der scFv Antikörper an HBV-Partikeln

Je 2mg gereinigter scFv-Antikörper wurden biotinyliert um die Bindung an HBV-Virus in einem ELISA nachzuweisen. Hierzu wurde eine ELISA-Platte mit polyklonalen IgG Ziege anti-HbsAg Serum 1:2000 beschichtet, um HBV-Partikel aus einem Maus Serum zu binden. Das Serum einer mit HBV transfizierten transgenen C57BL/6 Maus wurde 1:2 (PBS+10% HBV negatives Mausserum) verdünnt und auf die beschichtet Platte gegeben. Außerdem wurde rekombinates HbsAg in den Konzentrationen 1µg, 0,1µg und 0,01µg pro Kavität eingesetzt, sowie als Negativkontrolle nur PBS/10% HBV negatives Mausserum. Das HBV negative Mausserum stammte ebenfalls von einer C57BL/6 Maus.

Die HBV Proteine auf der so beschichteten ELISA-Platte durch die biotinylierten scFv-Antikörper versucht nachzuweisen. Hierzu wurde je Kavität 1µg scFv-Antikörper in PBS zugegeben und anschließend mit Streptavidin-POX 1:4000 (Behring) detektiert. Bei der

Positivkontrolle wurde an Stelle des scFv-Antikörpers polyklonales Schaf anti-HbsAg Serum eingesetzt. Das rekombinante lösliche Antigen stammte von Smith Kline Beachem und wurde ebenso wie die Antikörper von der Gruppe von Prof. Dr. Heinz Schaller, ZMBH zur



Verfügung gestellt. In der nachfolgenden Abbildung sind die ELISA-Ergebnisse dargestellt.

Die beiden scFv-Klone sind in der Lage, sowohl das rekombinantes HbsAg, als auch die Viruspartikel im Serum der Maus zu erkennen. Daß die OD-Werte niedriger sind als bei der Positivkontrolle ist zu erwarten, da ein scFv-Fragment nur eine Bindungsstelle pro Antikörper hat und nicht zwei wie im Falle von Serum-Antikörper.

6.5 Konstruktion eines neuen universellen PCR Primer-Satzes zur Herstellung universeller Antikörperbibliotheken

Wegen der Schwierigkeiten mit der alten universellen Antikörperbibliothek (Little, Welschhof et al. 1999), erschien es sinnvoll, einen neuen verbesserten Primersatz zu konstruieren. Diese Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Petra Rohrbach, einer weiteren Doktorandin in der Arbeitsgruppe, durchgeführt.

Der neue Primersatz beinhaltet 52 5' Primer zur Amplifikation der leichten und schweren variablen Immunglobulinketten, sowie 7 klassenspezifische 3' Primer welche im konstanten Bereich (CH-1 Domäne) der jeweiligen Ketten hybridisieren. Die Nukleotidsequenzen leiten sich von den Keimbahngenen, die in der V-Base und Kabat-Datenbank (Tomlinson 1997), (Kabat 1991) veröffentlicht sind, ab. Für jede Subgruppe wurde ein eigener Primersatz entwickelt der die Variabilität in einer Subgruppe abdeckt und sie möglichst vollständig amplifiziert. Zudem wurde bei allen Primern, bei denen es möglich war ohne zu viele Abweichungen von den humanen Sequenzen, die in *E. coli* verwendete Aminosäure Kodierung benutzt. Hierdurch soll eine optimale Proteinexpression in *E. coli* im Anfangsbereich der rekombinanten Immunglobulinketten gewährleistet werden (John Wiley & Sons 1999).

Primer-Sequenzen für die erste PCR

		Schwere Kette	Leichte Kette l	Leichte Kette k
V A R I A B L E	D O M Ä N E N	VH-1 VH-1a. CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT VH-1b. CAG GTC CAG CTT GTG CAG TCT VH-1c. CAG GTC CAG CTG GTA CAG TCT VH-1d. GAG GTC CAG CTG GTA CAG TCT VH-1e. CAG ATG CAG CTG GTA CAG TCT VH-2 VH-2a. CAG ATC ACC TTG AAG GAG TCT VH-2b. CAG GTC ACC TTG AAG GAG TCT VH-3 VH-3a. GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT VH-3b. CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT VH-3c. GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT VH-4 VH-4a. CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG VH-4b. CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG VH-4c. CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG VH-5 VH-5. GAA GTG CAG CTG GTG CAG TCT VH-6 VH-6. CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA VH-7 VH-7. CAG GTG CAG CTG GTG CAA TCT	VL-1 VL-1a. CAG TCT GTG CTG ACG CAG CCA VL-1b. CAG TCT GTG CTG ACG CAG CCG VL-2 VL-2. CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT VL-3 VL-3a. TCC TAT GAG CTG ACA CAG CCA VL-3b. TCC TCT GAG CTG ACA CAG GAC VL-3c. TCC TAT GTG CTG ACA CAG CCA VL-3d. TCC TAT GAG CTG ACA CAG CTA VL-3e. TCC TAT GAG CTG ATG CAG CCA VL-4 VL-4a. CTG CCT GTG CTG ACT CAG CCC VL-4b. CAG CCT GTG CTG ACT CAA TCA VL-4c. CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG VL-5 VL-5a. CAG CCT GTG CTG ACT CAG CCA VL-5b. CAG GCT GTG CTG ACT CAG CCG VL-6 VL-6. AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC VL-7 VL-7a. CAG ACT GTG GTG ACT CAG GAG VL-7b. CAG GCT GTG GTG ACT CAG GAG VL-8 VL-8. CAG ACT GTG GTG ACC CAG GAG VL-9 VL-9. CAG CCT GTG CTG ACT CAG CCA VL-10 VL-10. CAG GCA GGG CTG ACT CAG CCA	Vk-1 Vk-1a. GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT Vk-1b. AAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT Vk-1c. GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT Vk-1d. GAC ATC CAG TTG ACC CAG TCT Vk-1e. GCC ATC CGG ATG ACC CAG TCT Vk-1f. GTC ATC TGG ATG ACC CAG TCT Vk-1g. GCC ATC CAG ATG ACC CAG TCT Vk-2 Vk-2a. GAT ATT GTG ATG ACC CAG ACT Vk-2b. GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT Vk-2c. GAT ATT GTG ATG ACT CAG TCT Vk-3 Vk-3a. GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT Vk-3b. GAA ATT GTG ATG ACG CAG TCT Vk-3c. GAA ATT GTA ATG ACG CAG TCT Vk-4 Vk-4. GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT Vk-5 Vk-5. GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT Vk-6 Vk-6a. GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT Vk-6b. GAT GTT GTG ATG ACA CAG TCT

Tabelle 2: Neue 5' PCR Primer für die humanen variablen Immunglobulin Genregionen, die spezifisch für die einzelnen Subgruppen der leichten Immunglobulinketten sind. Der Primersatz besitzt keine „wobble“ Positionen mehr und benutzt die *E coli* „codon usage“.

		Schwere Kette	Leichte Kette l	Leichte Kette k
K O N S T A N T E	D O M Ä N E N	IgM IgM AAG GGT TGG GGC GGA TGC ACT	C-1 GGA CGG.CGG.GAA.CAG.AGT.GAC	C-k GAC AGA TGG TGC AGC CAC AGT
		IgG IgG GAC CGA TGG GCC CTT GGT GGA		
		IgD IG D CAC ATC CGG AGC CTT GGT GGG		
		IgE		
		IgEa. GAC GGA TGG GCT CTG TGT GGA		
		IgEb. GGA TGG GCT CTG TGT GGA GGC		
		IgEc. GGG GAA GAC GGA TGG GCT CTG		
		IgA IgA GAC CTT GGG GCT GGT CGG GGA		

Tabelle 3: Neue 5' PCR Primer für die humanen variablen Immunglobulin Genregionen, die spezifisch für die einzelnen Subgruppen und für die konstanten 5' CH1 Regionen der einzelnen Immunglobulinketten sind. Der Primersatz besitzt keine „wobble“ Positionen mehr und benutzt die *E coli* „codon usage“.

Primer-Sequenzen mit Restriktionsschnittstellen für die zweite PCR

		Schwere Kette	Leichte Kette l	Leichte Kette k
V D A R M I Ä A N B E L N		VH-1 VH-1a. TGG ACG CCC ATG GCG CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT VH-1b. TGG ACG CCC ATG GCG CAG GTC CAG CTT GTG CAG TCT VH-1c. TGG ACG CCC ATG GCG CAG GTC CAG CTG GTA CAG TCT VH-1d. TGG ACG CCC ATG GCG GAG GTC CAG CTG GTA CAG TCT VH-1e. TGG ACG CCC ATG GCG CAG ATG CAG CTG GTA CAG TCT VH-2 VH-2a. TGG ACG CCC ATG GCG CAG ATC ACC TTG AAG GAG TCT VH-2b. TGG ACG CCC ATG GCG CAG GTC ACC TTG AAG GAG TCT VH-3 VH-3a. TGG ACG CCC ATG GCG GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT VH-3b. TGG ACG CCC ATG GCG CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT VH-3c. TGG ACG CCC ATG GCG GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT VH-4 VH-4a. TGG ACG CCC ATG GCG CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG VH-4b. TGG ACG CCC ATG GCG CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG VH-4c. TGG ACG CCC ATG GCG CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG VH-5 VH-5 TGG ACG CCC ATG GCG GAA GTG CAG CTG GTG CAG TCT VH-6 VH-6 TGG ACG CCC ATG GCG CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA VH-7 VH-7 TGG ACG CCC ATG GCG CAG GTG CAG CTG GTG CAA TCT	Vλ-1 Vλ-1a. CCT ACA GAA CGC GTA CAG TCT GTG CTG ACG CAG CCA Vλ-1b. CCT ACA GAA CGC GTA CAG TCT GTG CTG ACG CAG CCG Vλ-2 Vλ-2 CCT ACA GAA CGC GTA CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT Vλ-3 Vλ-3a. CCT ACA GAA CGC GTA TCC TAT GAG CTG ACA CAG CCA Vλ-3b. CCT ACA GAA CGC GTA TCC TCT GAG CTG ACA CAG GAC Vλ-3c. CCT ACA GAA CGC GTA TCC TAT GTG CTG ACA CAG CCA Vλ-3d. CCT ACA GAA CGC GTA TCC TAT GAG CTG ACA CAG CTA Vλ-3e. CCT ACA GAA CGC GTA TCC TAT GAG CTG ATG CAG CCA Vλ-4 Vλ-4a. CCT ACA GAA CGC GTA CTG CCT GTG CTG ACT CAG CCC Vλ-4b. CCT ACA GAA CGC GTA CAG CCT GTG CTG ACT CAA TCA Vλ-4c. CCT ACA GAA CGC GTA CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG Vλ-5 Vλ-5a. CCT ACA GAA CGC GTA CAG CCT GTG CTG ACT CAG CCA Vλ-5b. CCT ACA GAA CGC GTA CAG GCT GTG CTG ACT CAG CCG Vλ-6 Vλ-6 CCT ACA GAA CGC GTA AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC Vλ-7 Vλ-7a. CCT ACA GAA CGC GTA CAG ACT GTG GTG ACT CAG GAG Vλ-7b. CCT ACA GAA CGC GTA CAG GCT GTG GTG ACT CAG GAG Vλ-8 Vλ-8 CCT ACA GAA CGC GTA CAG ACT GTG GTG ACC CAG GAG Vλ-9 Vλ-9 CCT ACA GAA CGC GTA CAG CCT GTG CTG ACT CAG CCA Vλ-10 Vλ-10 CCT ACA GAA CGC GTA CAG GCA GGG CTG ACT CAG CCA	Vκ-1 Vκ-1a. CCT ACA GAA CGC GTA GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT Vκ-1b. CCT ACA GAA CGC GTA AAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT Vκ-1c. CCT ACA GAA CGC GTA GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT Vκ-1d. CCT ACA GAA CGC GTA GAC ATC CAG TTG ACC CAG TCT Vκ-1e. CCT ACA GAA CGC GTA GCC ATC CGG ATG ACC CAG TCT Vκ-1f. CCT ACA GAA CGC GTA GTC ATC TGG ATG ACC CAG TCT Vκ-1g. CCT ACA GAA CGC GTA GCC ATC CAG ATG ACC CAG TCT Vκ-2 Vκ-2a. CCT ACA GAA CGC GTA GAT ATT GTG ATG ACC CAG ACT Vκ-2b. CCT ACA GAA CGC GTA GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT Vκ-2c. CCT ACA GAA CGC GTA GAT ATT GTG ATG ACT CAG TCT Vκ-3 Vκ-3a. CCT ACA GAA CGC GTA GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT Vκ-3b. CCT ACA GAA CGC GTA GAA ATT GTG ATG ACG CAG TCT Vκ-3c. CCT ACA GAA CGC GTA GAA ATT GTA ATG ACG CAG TCT Vκ-4 Vκ-4 CCT ACA GAA CGC GTA GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT Vκ-5 Vκ-5 CCT ACA GAA CGC GTA GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT Vκ-6 Vκ-6a. CCT ACA GAA CGC GTA GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT Vκ-6b. CCT ACA GAA CGC GTA GAT GTT GTG ATG ACA CAG TCT

Tabelle 4: Neue 5' PCR Primer zum Einfügen der Klonierungsrestriktionsschnittstellen in die humanen variablen Immunglobulin Genregionen. Der Primersatz ist spezifisch für die einzelnen Subgruppen der leichten und schweren Immunglobulinketten. Der Primersatz besitzt keine „wobble“ Positionen mehr und benutzt die *E. coli* „codon usage“.

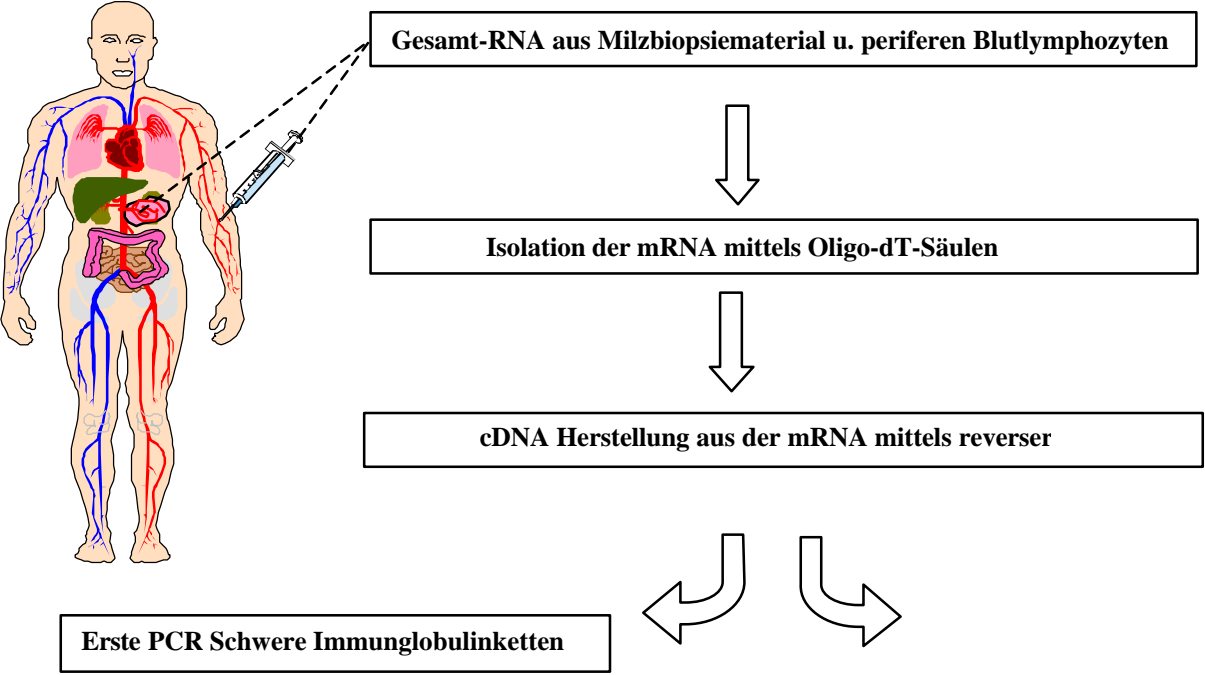
		Schwere Kette	Leichte Kette l	Leichte Kette k
K				
O	D	IgM IgM TGG GAA AAG CTT AAG GGT TGG GGC GGA TGC ACT		
N	O	IgG IgG AGC CAG AAG CTT GAC CGA TGG GCC CTT GGT GGA		
S	M	IgD IG D CTA CAC AAG CTT CAC ATC CGG AGC CTT GGT GGG		
T	Ä	IgE IgEa AGG CAG AAG CTT GAC GGA TGG GCT CTG TGT GGA	C-l GGG CGG CAG GGC GGC CGC GGA CGG.CGG .GAA.CAG.AGT.GAC	C-k GGG CGG CAG GGC GGC CGC GAC AGA TGG TGC AGC CAC AGT
A	N	IgEb. AGG CAG AAG CTT GGA TGG GCT CTG TGT GGA GGC		
N	E	IgEc. AGG CAG AAG CTT GGG GAA GAC GGA TGG GCT CTG		
T	N	IgA IgA TTC CAG AAG CTT GAC CTT GGG GCT GGT CGG GGA		
E				

Tabelle 5: Neue 5' PCR Primer zum Einfügen der Klonierungsrestriktionsschnittstellen in die humanen variablen Immunglobulin Genregionen. Der Primersatz ist spezifisch für die konstanten regionen der einzelnen Klassen der schweren und leichten Immunglobulinketten. Der Primersatz besitzt keine „wobble“ Positionen mehr und benutzt die *E coli* „codon usage“.

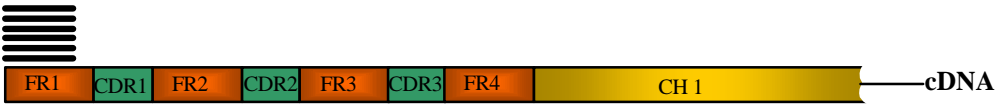
Für die Klonierung der rekombinanten Immunglobulinketten werden Restriktionschnittstellen benötigt, wofür ein zweiter Primersatz entwickelt wurde. Für die variablen Genregionen der schweren Immunglobulinketten wurde *Nco* I und *Hind* III benutzt und für die leichten Ketten *Mlu* I und *Not*I.

Obwohl *Nco* I und *Hind* III in den funktionellen variablen Genen schneiden, wurde von einer Veränderung der alten Schnittstellen abgesehen, um eine Kompatibilität mit bereits bestehenden Bibliotheken bzw. Expressionsvektoren, wie zB. pHOG oder pOBE zu gewährleisten (Dubel, Breitling et al. 1993; Kipriyanov, Kupriyanova et al. 1996).

Die neue Bibliothek sollte aus zehn Spendern erstellt werden. Hierfür stand erstmals von fünf Spendern Milzbiopsiematerial zur Verfügung, von weiteren fünf Spendern wurden periphere Blutlymphozyten verwendet. Ich beschreibe in meiner Dissertation die Erstellung der Milzbibliothek sowie die Primerspezifitätstests, in gleicherweise wurde eine Bibliothek aus peripheren Blutlymphozyten hergestellt (Dissertation, Petra Rohrbach).



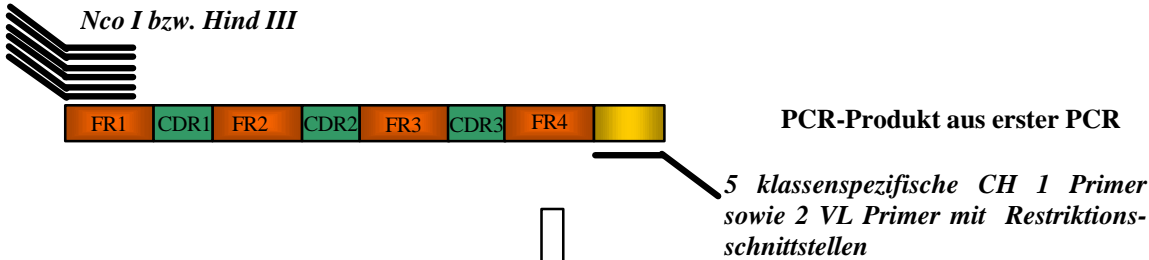
16 VH Primer



5 klassenspezifische CH 1 Primer
IgM, IgD, IgG, IgE und Ig A

Zweite PCR schwere Immunglobulinketten

16 VH Primer mit den
Restriktionschnittstellen
Nco I bzw. Hind III

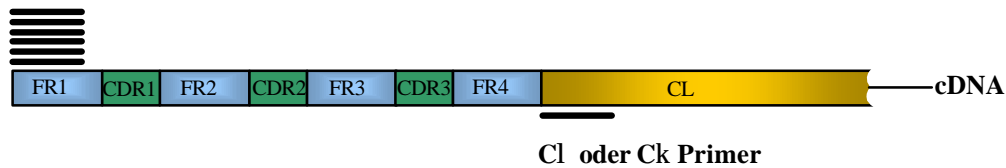


Restriktionsverdau der zweiten PCR,
Klonierung der VH Ketten in pEXHAM
und Transformation in *E.coli*



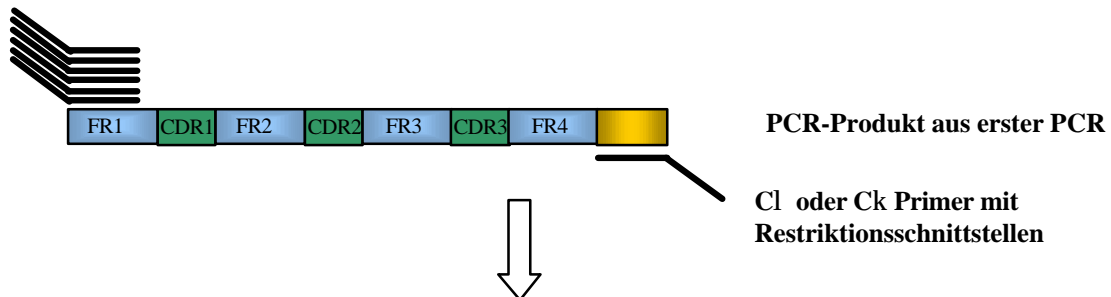
Erste PCR leichte Immunglobulinketten

36 V_L oder V_K Primer



Zweite PCR leichte Immunglobulinketten

36 V_L oder V_K Primer mit
Restriktionsschnittstellen
Mlu I und Not I



Restriktionsverdau der zweiten PCR und
Klonierung der VL-Ketten in die Sub-
bibliothek und Transformation in *E.coli*.

Fertige
rekombinante scFv-Antikörper-
expressionsbibliothek



Abbildung 13: Konstruktion einer single chain Bibliothek . Nach Gewinnung der Gesamt-mRNA werden die leichten und schweren Immunglobulinketten mit spezifischen Primern amplifiziert und in einer zweiten PCR mit Restriktionsschnittstellen versehen. Die zweite PCR der schweren Kette wird nach einem Restriktionsverdau in den Oberflächenexpressionsvektor pEXHAM1 kloniert und bildet die Subbibliothek. In diese Subbibliothek werden im Anschluß die leichten Immunglobulinketten kloniert. Nach der Verpackung mit einem Helferphagen ist die „single-chain“ Bibliothek fertiggestellt.

P/O: Promotor mit Operator, FR: Framework, CDR: Antigenbindungsstelle, CH: Konstrante Region der schweren Kette, CL. Konstante Region der leichten Kette Yol: Yol-Epitop aus humanen Tubulin, VH: variable Region der schweren Kette, VL: variable region der leichten Kette pIII: Protein pIII des fd Phagen, pel B: Signalsequenz aus der Pektatylase *Erwinia carotovora*, 6His: 6 Histidinreste zur Metallchelate Affinitätsaufreinigung, cmyc: c-myc Epitop dem p62^{c-myc} protein, *: Amber-Stopcodon (UAG)

Für die Konstruktion einer neuen Antikörperbibliothek wurde zunächst die Gesamt-RNA aus Milzbiopsiematerial unter Verwendung des Qiagen RNasy Midikits gewonnen. Hierzu wurden ca 2g Milz auf Trockeneis zerschnitten und in RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol (Puffer ist Bestandteil des Kits) aufgenommen. Nach dem Homogenisieren durch einen Rotor-Stator, anschließender Zentrifugation (Heraeus-Megafuge, Rotor 3360 4500rpm), sowie Aufnahme in 1 Vol. Ethanol wurde weiter laut Qiagen RNasy Protokoll verfahren. Zur Überprüfung der isolierten Gesamt-RNA wurde eine Fomaldehyd-Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Aus der Gesamt-RNA wurde anschließend die mRNA gewonnen. Hierfür wurde der Oligotex-mRNA-Kit der Firma Qiagen, (Hilden) benutzt. Es wurde dafür jeweils 250-500 μ g Gesamt-RNA eingesetzt. Die Ausbeute an mRNA ist zu gering um sie in einer FA-Agarosegelelektrophorese darstellen zu können. Über die Ausbeute an Gesamt-RNA wurde die mRNA abgeschätzt. Es wurden ungefähr 50-500ng mRNA zur cDNA-Synthese („first strand“) eingesetzt, hierfür wurden Oligo-dT Primer und der SUPERSCRIPT™ II RNase H–Reverse Transcriptasekit der Firma GibcoBRL eingesetzt.

Zur Amplifizierung der variablen Immunglobulinketten wurde der neuentwickelte Primersatz mit einer c-DNA eines Milzspenders getestet. Hierzu wurden geschätzte 5-50ng (0,5 μ l) c-DNA („first strand“) als Template in der PCR eingesetzt. Da die Mengen an c-DNA zu gering sind um sie photometrisch zu messen, kann die eingesetzte Menge an „template“ nur über die Ausbeute an Gesamt-RNA abgeschätzt werden. Normalerweise sind 1-5% der Gesamt-RNA mRNA und werden folglich in c-DNA umgeschrieben.

6.5.1 Amplifizierung der Immunglobulinketten mit dem ersten Primersatz

Um die richtige Zyklenzahl und die beste Hybridisierungstemperatur zuermitteln, wurden verschiedene Temperaturen (55-65 °C) und Zyklenzahlen (15, 20, 25) getestet.

Die PCR Bedingungen, unter denen das beste Ergebnis erreicht wurde, lauteten 3min 95°C (Predenaturierung), sowie 20Zyklen mit 30sec 95°C (Denaturierung), 1min 55°C (Hybridisierung), 1min 72°C (Polymerisation) abschließend 5min 72°C. Für die PCR wurden neben den 52 5' Primern für die variablen Regionen der konstante IgM 3' Primer eingesetzt.

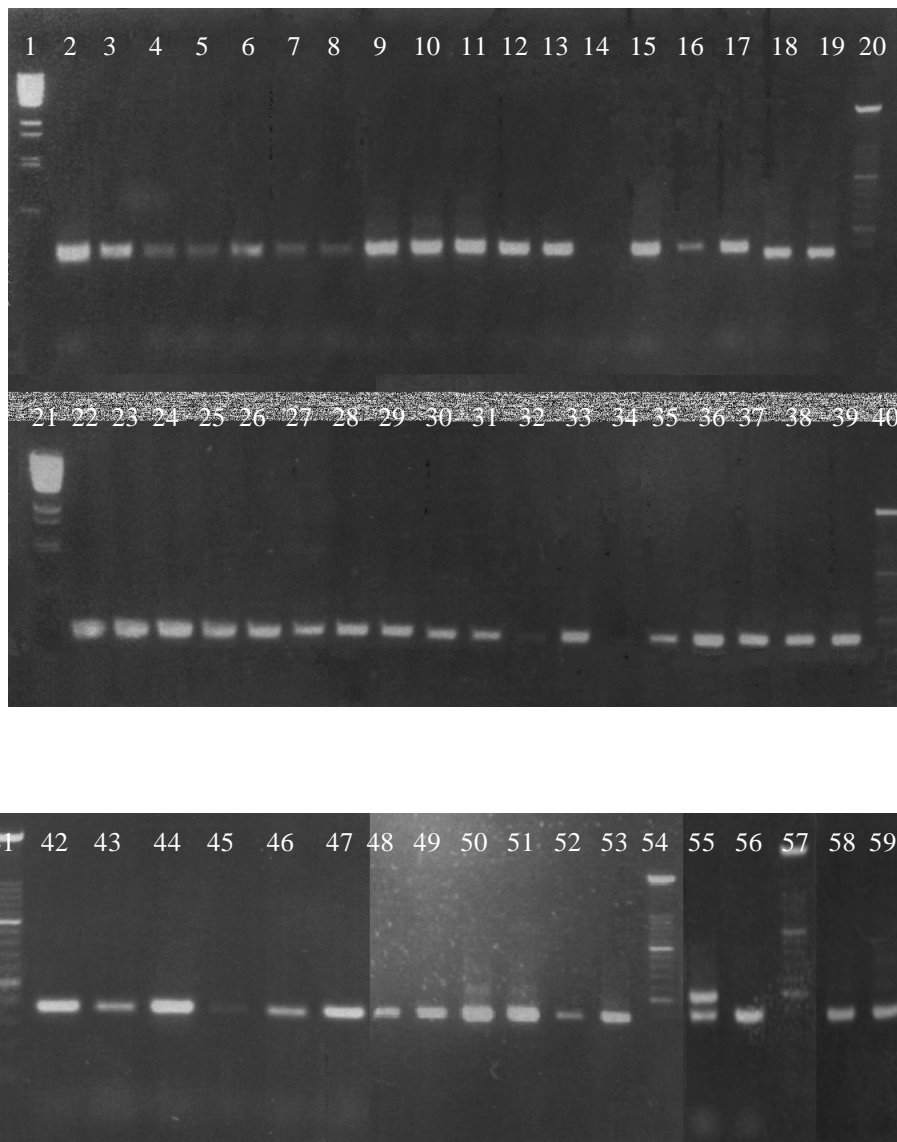


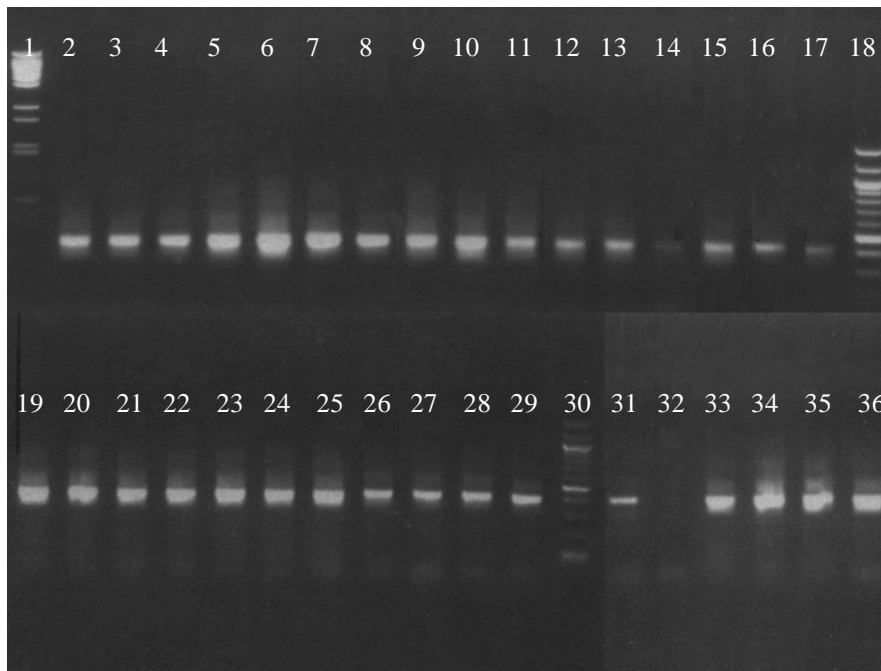
Abbildung 14: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte, die mit dem modifizierten ersten Primersatz amplifiziert wurden. Auftrag je 5µl der ersten PCR Spur 40, 41, 54+57 100bp Marker, Spur1+21 λ BstEII Marker, Spur 2-6VH1a-e, Spur7-8VH2a-b, Spur9-11VH3a-c, Spur12-14VH4a-c, Spur15 VH5,Spur16 VH6, Spur 17 VH7, Spur18,19;22-26 Vκ1a-g,Spur 27-29 Vκ2a-c, Spur30-32 Vκ3a-c, Spur33 Vκ4, Spur 34Vκ5,

Spur35-36 Vκ6a-b, Spur37-38 Vλ1a-b, Spur 39 Vλ2, Spur 42-46 Vλ3a-e, Spur 47-49 Vλ4a-c, Spur 50-51 Vλ5a-b, Spur 52 Vλ 6a, Spur 53+55 Vλ 7a-b, Spur 56 Vλ 8, Spur 58 Vλ 9, Spur 59 Vλ10.

Bei allen Primerkombinationen wurde ein Produkt der erwarteten Größe (0,4KB) amplifiziert. Neben der Hauptbande wurde in einem Fall (Vλ 7b) eine unspezifische Bande amplifiziert.

6.5.2 Einführung von Restriktionschnittstellen in die Produkte der ersten PCR

Zur Einführung von Restriktionschnittstellen, um die Immunglobulinketten in einen Oberflächenexpressionsvektor klonieren zu können, ist eine zweite PCR nötig. Zur Reduktion von unspezifischen Amplifikationen wurde die erste PCR mit Hilfe des PCR Purifikationkits (Firma Qiagen, Hilden) aufgereinigt und in 80µl H₂O aufgenommen. 5µl wurden als „Template“ in der zweiten PCR eingesetzt. Die optimalen PCR-Bedingungen lauteten hier wie bei der ersten PCR; 3min 95°C (Predenaturierung), sowie 20 Zyklen mit 30sec 95°C (Denaturierung), 1min 55°C (Hybridisierung), 1min 72°C (Polymerisation), abschließend 5min 72°C.



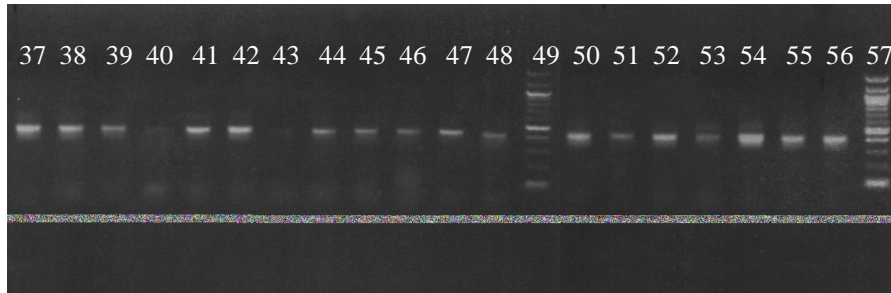


Abbildung 15: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte, die mit dem modifizierten zweiten Primersatz amplifiziert wurden. Auftrag je Spur 5µl der zweiten PCR. Spur 18, 30, 49+57 100bp Marker, Spur1 λ BstEII Marker, Spur 2-6VH1a-e, Spur7-8VH2a-b, Spur9-11VH3a-c, Spur12-14VH4a-c, Spur15 VH5, Spur16 VH6, Spur 17 VH7, Spur19-25 V κ 1a-g, Spur 26-28 V κ 2a-c, Spur29, 31-32 V κ 3a-c, Spur33 V κ 4, Spur 34V κ 5, Spur35-36 V κ 6a-b, Spur37-38 V λ 1a-b, Spur 39 V λ 2, Spur 40-44 V λ 3a-e, Spur 45-47 V λ 4a-c, Spur 48+50 V λ 5a-b, Spur 51 6a, Spur 52+53 7a-b, Spur 54 V λ 8, Spur 55 V λ 9, Spur 56 V λ 10.

Auch bei der zweiten PCR wurde mit allen Primern ein spezifisches Produkt von ca. 400bp erzielt. Kreuzkontaminierende Banden sind auf ein Mindestmaß reduziert.

6.6 Überprüfung der Primerspezifität der konstanten Primer

Um die Spezifität der konstanten Primer zu überprüfen, wurde ein Mix der 16 5' VH Primern, sowie jeweils einen Subklassen (IgM, IgG, IgA, IgD und IgE) spezifischen 3' Primer eingesetzt. Zur Überprüfung der Primerspezifität wurde immer dieselbe c-DNA eines bestimmten Milz- bzw. Blutspenders verwendet.

Zuerst wurde mit der jeweiligen c-DNA eine erste PCR wie in 6.5.1 beschrieben durchgeführt, jedoch mit dem Unterschied, daß ein 5' VH Primermix aus allen Primern verwendet wurde. Die Produkte aus dieser ersten PCR wurden dann als Template in einer zweiten PCR eingesetzt. Alle 5 Klassenspezifischen Reaktionsprodukte wurden in der zweiten PCR erneut mit den unterschiedlichen 3' Primern amplifiziert, so daß, falls die Primer spezifisch wären, nur im Falle der jeweiligen Subklasse ein Produkt entstehen sollte. Diese Tests waren sehr aufwendig, da unterschiedliche Hybridisierungstemperaturen ausprobiert wurden. Die Darstellung aller Ergebnisse und der daraus gewonnenen Veränderungen für die Wiederholung der PCR's würde den Rahmen dieser Dissertation sprengen, so daß ich mich hier auf die Darstellung der spezifischsten Ergebnisse beschränke.

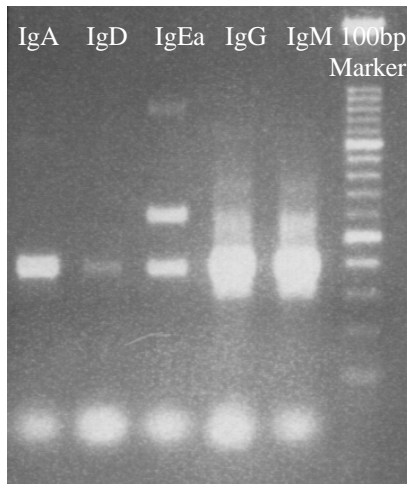


Abbildung 17: Agarosegelelektrophorese der Amplifikation der Immunglobulinketten mit einem Mix aller 5' VH-Primern und den 5 Subklassen spezifischen konstanten 3' Primern. Die PCR mit dem IgEa 3' Primer zeigt außer der gewünschten 400bp Bande noch zwei weitere unspezifische Banden. Als Template wurde hier Milz c-DNA verwendet.

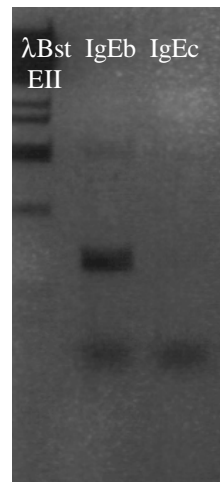


Abbildung 16: Agarosegelelektrophorese der beiden alternativen IgE 3' Primer. IgEb gibt gute Ausbeuten Bereich der 400bp Bande und geringe Kreuzreaktionen. Die PCR mit IgEc ergibt nur eine schwache 400bp Bande unter den gleichen Bedingungen wie IgEb. Als Template wurde auch hier wieder Milz cDNA verwendet.

Mit allen Primern konnte in der ersten PCR ein Produkt der richtigen Größe (ca.400bp) amplifiziert werden. Allerdings erzeugt der IgEa Primer außer der gewünschten 400bp Bande noch zwei weitere Banden, die sich trotz Veränderung der PCR-Bedingungen nicht beseitigen ließen. Deshalb wurden zwei neue Primer generiert, die im gleichen konstanten Bereich der CH1 Domäne binden, jedoch um eine Aminosäure in 5' bzw. zwei Aminosäuren in 3' Richtung verschoben wurden. Ziel war es, spezifischer bindende Primer zu generieren.

Diese erste PCR wurde auch mit Blut cDNA durchgeführt, die hierbei erhaltenen Produktmengen sind jedoch deutlich geringer als bei der Milz cDNA, so daß auf eine Darstellung der Ergebnisse verzichtet wird. Im Prinzip zeigt die erste PCR mit Blut cDNA, die gleichen Ergebnisse wie die mit Milz cDNA.

Um die Spezifität der Primer zu zeigen, wurden die Produkte der ersten PCR als Matrize in einer zweiten PCR benutzt und wechselseitig mit dem VH Mix und dem jeweiligen 3' Primern amplifiziert. Die PCR Bedingungen mit denen das beste Ergebnis erzielt wurde lauten 3min 95°C, 15 Zyklen 30sec 95°C, 1min 60°C, 1min 72°C abschließend 5min 72°C. Nur im Falle des IgM 3' Primers wurde bereits bei 55°C eine ausreichende Spezifität erreicht

(Ergebnis nicht gezeigt). Diese Hybridisierungstemperatur wurde später auch zur Konstruktion einer IgM Antikörperbibliothek verwendet.

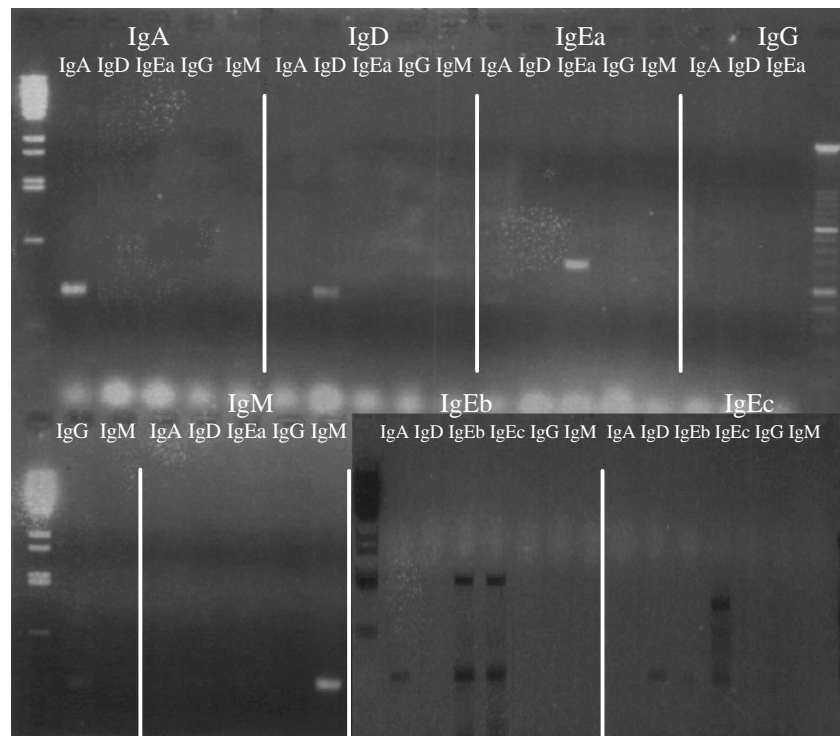


Abbildung 18: Agarosegelelektrophorese der zweiten PCR zur Ermittlung der Primerspezifität. Die Produkte der ersten PCR (oberste Zeile der Beschriftung) wurden wechselseitig in einer zweiten PCR als „template“ eingesetzt (untere Zeile der Beschriftung). Als c-DNA für die erste PCR diente hier ein Blutspender. Marker: 100bp Marker und Lambda *BSTEII* Marker

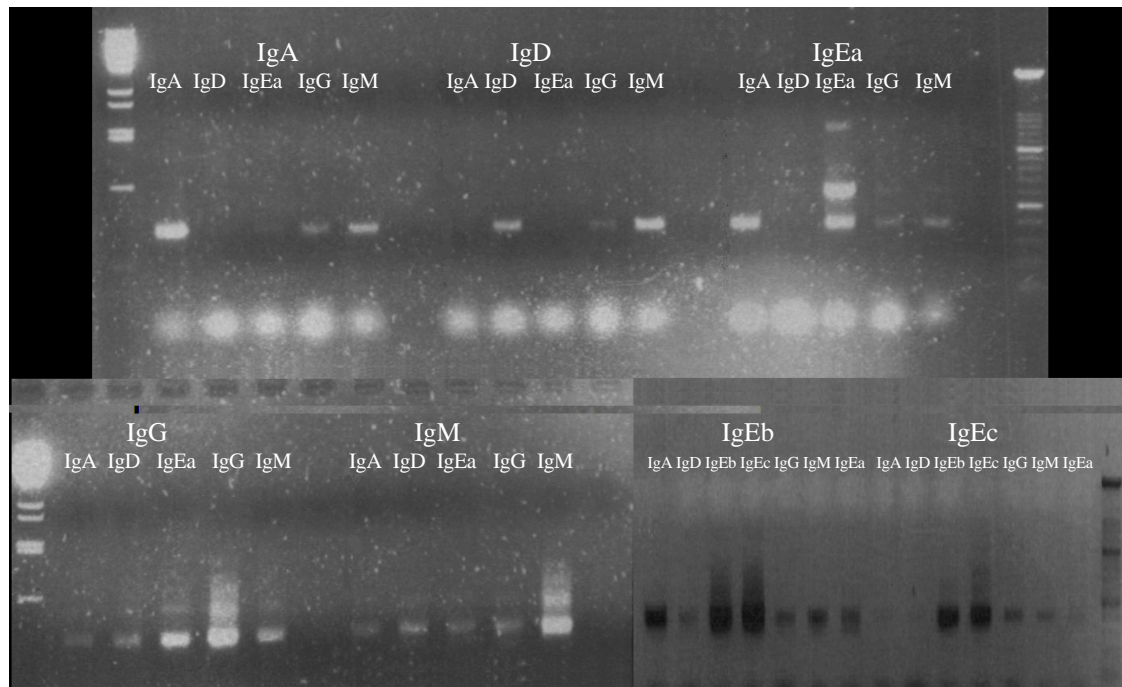


Abbildung 19: Agarosegelelektrophorese der zweiten PCR zur Ermittlung der Primerspezifität. Die Produkte der ersten PCR (oberste Zeile der Beschriftung) wurden wechselseitig in einer zweiten PCR als „template“ eingesetzt (untere Zeile der Beschriftung). Als c-DNA für die erste PCR diente hier ein Milzspender. Marker: 100bp Marker und Lamda *B*STEII Marker

Die Ergebnisse bei 60°C Hybridisierungstemperatur sind sehr spezifisch im Falle der Blut cDNA (Abbildung 18). Lediglich die IgE Primer zeigen untereinander eine gewisse Kreuzreaktivität was aber auf Grund der geringen Sequenzunterschiede zu erwarten ist. IgEb reagiert außerdem noch ein wenig mit IgA-PCR-Produkt

Bei der Verwendung der ersten PCR Produkte die mit Milz c-DNA amplifiziert wurden, kommt es vereinzelt noch zu stärkeren Kreuzreaktionen mit anderen Klassen (Abbildung 19). Der IgA Primer z.B. bindet noch leicht an das IgM PCR-Produkt der ersten PCR. Die Subgruppen spezifischen Banden sind aber immer stärker als die eventuellen Kreuzreaktionen, lediglich bei IgD ist die Hauptbande etwas schwächer als die Kreuzreaktion mit IgM. Dies verbessert sich aber wenn, man die Hybridisierungstemperatur auf 60°C erhöht. Die oben dargestellten Ergebnisse unter Verwendung von Milz cDNA wurden mit einer Hybridisierungstemperatur von 58°C erzielt.

6.6.1 Test der Primerspezifität durch Restriktionsverdau der Produkte aus der ersten PCR

Um zu testen, ob die amplifizierten V-Genregionen auch tatsächlich von der betreffenden Genpopulation abstammen, wurde ein Restriktionsverdautest ersonnen. Hierbei wurden in einer ersten PCR CH1-Primer verwendet, die Fab Fragmente erzeugen.

K O N S T A N T E N	C	
	H	IgM
	1	TGG AAG AGG CAC GTT CTT TTC
		IgD
	D	TGG CCA GCG GAA GAT CTC CTT
	O	IgA1+2
	M	TGG GCA GGG CAC AGT CAC ATC
	Ä	IgG1-4
T N E	N	AAC TCT CTT GTC CAC CTT GGT
		IgE
	E	GCT GAA GGT TTT GTT GTC GAC
	N	

Danach wurde nach einzigartigen Restriktionschnittstellen in der CH1 Region der einzelnen Klassen von Antikörpern gesucht. Diese Schnittstelle sollte so liegen, daß zwei unterschiedlich große Fragmente erzeugt werden, die in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden können. Außerdem wurde die oben dargestellte zweite PCR auf diesen Produkten wiederholt, um die Ergebnisse vergleichen zu können. In der unten gezeigten Abbildung sind diese dargestellt. Als „Template“ diente die selbe c-DNA eines Milzspender, die auch bei der PCR in Abbildung 19 benutzt wurde.

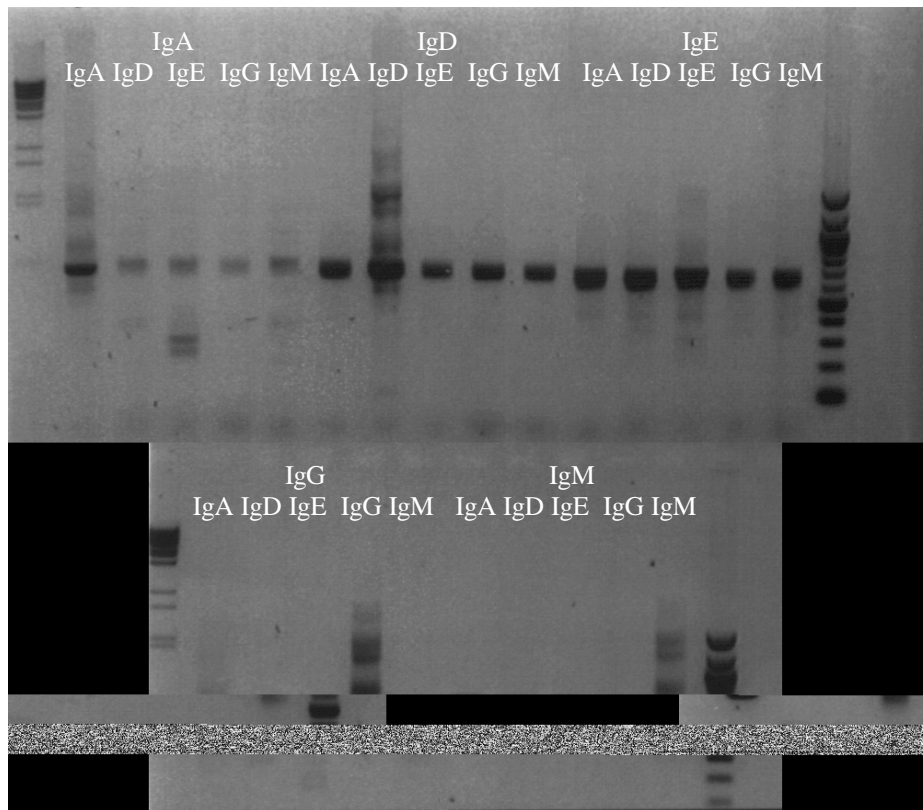


Abbildung 20: Erneute Agarosegelelektrophorese zur Ermittlung der Primerspezifität. Hierbei wurde die Produkte einer ersten PCR mit den CH1 Primern als „template“ eingesetzt (untere Zeile der Beschriftung). Als c-DNA für die erste PCR diente derselbe Milzspender wie in Abbildung 19. Auch die gleichen PCR-Bedingungen wurden verwendet. Marker: 100bp Marker und Lambda BstEII Marker

Das Ergebnis ist vergleichbar mit den in Abbildung 19 dargestellten, obwohl es etwas stärkere Kreuzreaktionen (IgG+IgD), als bei der oben dargestellten PCR gibt. Mit dem IgE Primer gibt es auf allen PCR-Templates ein Produkt, offensichtlich ist der Primer nicht klassenspezifisch. Um zu zeigen, daß die Produkte der ersten PCR klassenspezifisch sind, wurden sie mit einem, für die jeweilige Immunglobulinklasse spezifischen Restriktionsenzym geschnitten und die Produkte in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Folgende Restriktionsenzyme wurden verwendet, *PvuII* für IgA, *KpnI* für IgD, *ApaI* für IgG und *XmaI* für IgM. Mit dem IgE 3'Primer konnte nicht genügend Ausgangsmaterial für diesen Test gewonnen werden.

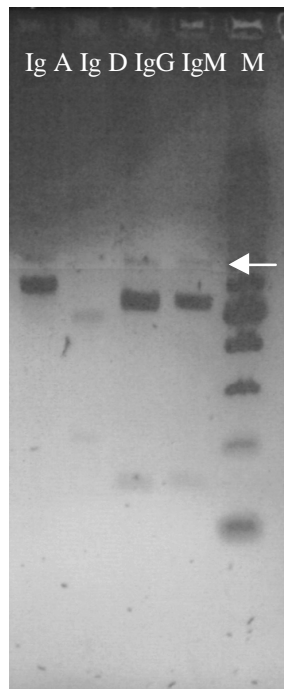


Abbildung 21: Restriktionsverdau der ersten PCR mit klassenspezifischen Restriktionsenzymen. *PvuII* für IgA, *KpnI* für IgD, *ApaI* für IgG und *XmaI* für IgM. Es entsteht jeweils ein großes Fragment (500-600bp) Und ein kleineres Fragment (100-200bp) Marker 100bp Leiter

Bei allen Ansätzen findet man ein kleines und ein großes Fragment, man findet keine signifikanten Mengen anderer Banden. Der Großteil der Produkte der ersten PCR wurde verdaut, lediglich ein kleiner Rest wurde nicht verdaut (weißer Pfeil). Auf Grund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, daß die erste PCR weitgehend spezifisch verlaufen ist.

6.7 Generierung einer IgM scFv-Antikörperbibliothek aus Milzgewebe

Nach erfolgreicher Isolation der mRNA von fünf Milzspendern und Umschreibung dieser in cDNA („first Strand“) wurde zunächst von allen Spendern eine erste PCR mit den in 6.5 beschriebenen Primern durchgeführt. Anschließend erfolgt eine Reamplifikation mit dem zweiten Primersatz zur Einführung der Restriktionschnittstellen. Die erhaltenen PCR Produkte wurden gelelektrophoretisch gereinigt und anschließend in einen modifizierten Vektor pEXHAM 1, der ein „Amber Stop Codon“ zwischen scFv- und dem pIII Gen besitzt, kloniert. Dies erleichtert u.a. die spätere Expression von scFv-Fragmenten, da sie nicht mehr umklont werden müssen.

Zuerst wurden VH-Subbibliotheken der einzelnen Spender hergestellt. Dafür wurden, die VH-Fragmente der zweiten PCR, über die Restriktionschnittstellen *Nco* I und *Hind* III in pEXHAM 1 kloniert. Die fertige VH-Subbibliothek wurde dann durch Elektroporation in *E.coli* XL1-Blue eingeschleust. Für jede Subbibliothek wurde eine Mindestkomplexität von 10^6 angestrebt und auch erreicht.

Für die Klonierungen der leichten Fragmente, wurden die Plasmide isoliert, mit *Mlu* I und *Not*I geschnitten und gelelektrophoretisch gereinigt. Der geschnittene Vektor wurde aus dem Gel isoliert und die $V\lambda+\kappa$ Fragmente kloniert. Mit dem Vektor, der jetzt die komplette rekombinante Bibliothek enthält, wurden wiederum *E.coli* *XL1-Blue* transformiert. Pro Transformation wurde eine Anzahl von 10^7 unabhängigen Klonen angestrebt. Durch Wiederholung dieser Transformationen läßt sich die Komplexität der Antikörperbibliothek ständig steigern. Ein Schema zum Bau der Bibliothek ist in (Abbildung 13) dargestellt.

6.8 Kontrolle der Klonierung durch Einzelklonrestriktionsanalyse

Im Falle der IgM Bibliothek aus Milzgewebe wurden zunächst 72 Einzelklone von zwei Spendern mittels Restiktionsanalyse untersucht. Die DNA der Einzelkone wurde zunächst isoliert und dann durch drei Restriktionsanalysen durchgeführt. Dabei wurden die schwere, die leichte Kette, sowie die gesamte scFv-Expressionskassette ausgeschnitten. Die jeweils verwendeten Restriktionsenzyme waren *Nco*I/*Hind*III (VH-Kette), *Mlu*I/*Not*I (VL-Kette), sowie *Nco*I/*Not*I für die Expressionskassette. In neun Fällen zeigten sich Auffälligkeiten, die in der nachfolgenden Abbildung gezeigt werden.

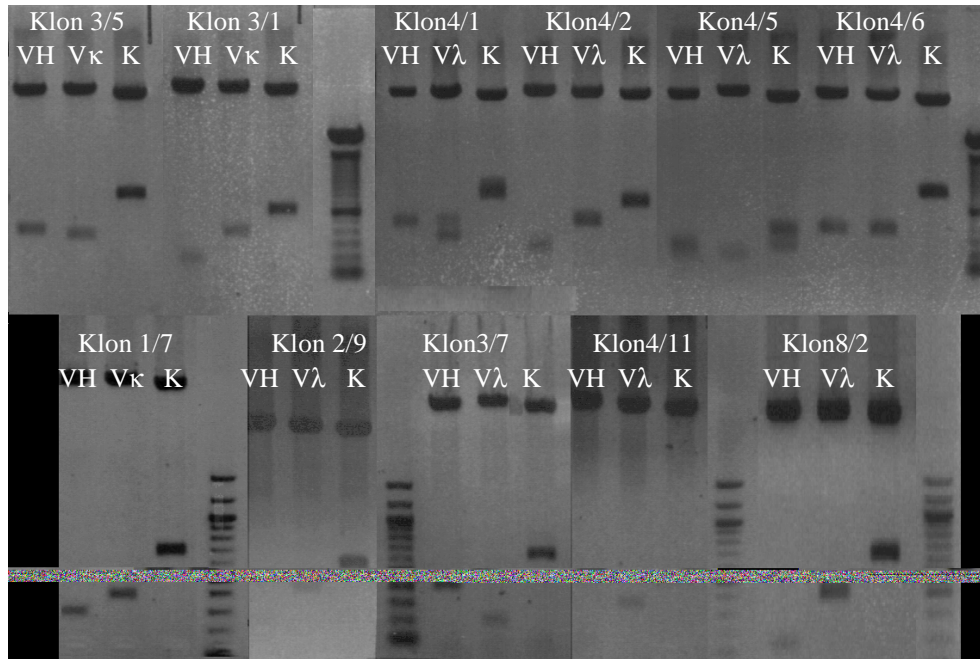


Abbildung 22: Negativdarstellung einer Agarosegelelektrophorese des Restriktionsverdaus einzelner Klone. VH: variable Region der schweren Kette (*NcoI/ HindIII*), VL+K variable Region der leichten Kette (*MluI/NotI*), K: scFv Kasette *NcoI/NotI* geschnitten. Pro Enzym wurden 2U und 5µl Minipräp DNA in einem ÜN-Verdau bei 37°C eingesetzt. Marker: 100bp Marker mit starker 500bp Bande.

Die Klone (3/5; 4/6) sind korrekt; sie besitzen eine vollständiges VH und VL Fragment. Bei den anderen neun Klonen ist mindestens ein Fragment (VH oder VL) zu klein. Klon 4/1 und 4/5 scheinen zusätzlich noch eine interne Schnittstelle in der leichten Kette zu haben.

Da diese verkürzten Formen vermieden werden sollten, wurde auf Grund der oben dargestellten Ergebnisse, vor der Klonierung der PCR-Fragmente in die Subbibliothek, eine zusätzliche Reinigung der Fragmente durch Agarosegelelektrophorese und Elution auf einem 3% Gel durchgeführt.

Nach dem erneuten Klonieren einer Bibliothek wurden wiederum 48 Klone ausgewählt und mittels Restriktionsverdau analysiert. Lediglich fünf Klone zeigten noch Auffälligkeiten, wie eine Doppelbande beim Verdau der schweren Immunglobulinkette oder beim Ausschneiden der scFv-Kasette. Diese Klone sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

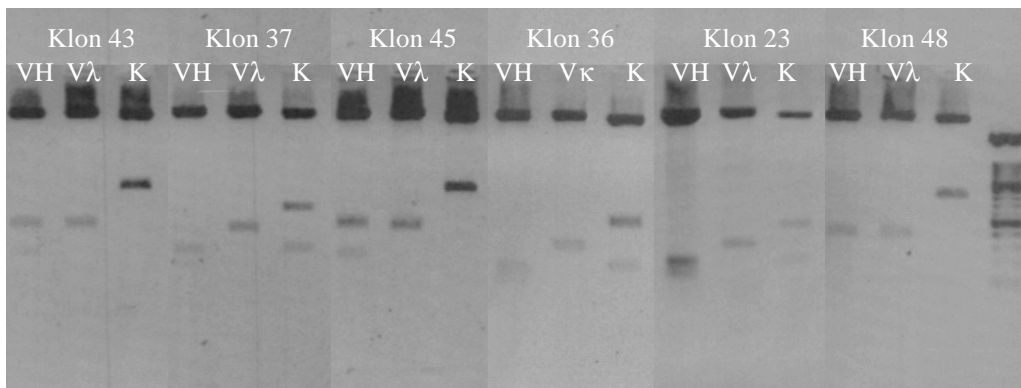


Abbildung 23: Negativdarstellung einer Agarosegelelektrophorese des Restriktionsverdaus einzelner Klone. VH: variable Region der schweren Kette (*NcoI*/ *HindIII*), Vλ+κ variable Region der leichten Kette (*MluI*/*NotI*), K: scFv Kassetten *NcoI*/*NotI* geschnitten. Marker: 100bp Marker mit starker 500bp Bande

Die Sequenzierung dieser Klone ergab, daß es sich um eine interne *NcoI* Schnittstelle der schweren Kette handelt, die durch Punktmutationen während der PCR, vornehmlich bei VH1 und VH3 Immunglobulinketten, entstehen.

6.9 Erneutes Screening gegen EGP 2 unter Verwendung der neuen Bibliothek mit einer Komplexität von $2 \cdot 10^8$

Bereits während der Konstruktion der Gesamtbibliothek wurden fertiggestellte Bibliotheken unterschiedlicher Spender verpackt, vereinigt und in einem Screening getestet. Die Komplexität der vereinigten Bibliotheken betrug zum Zeitpunkt des Screenings $2 \cdot 10^8$ unabhängige Klone. Durch wiederholtes Klonieren und Transformieren der einzelnen Spenderbibliotheken läßt sich diese Komplexität weiter steigern. Für einen ersten Test aber reicht eine Komplexität von $2 \cdot 10^8$ aus, da sich in der Vergangenheit bereits aus Phagedisplaybibliotheken dieser Größe brauchbare scFv-Antikörper gewinnen ließen (Dorsam, Rohrbach et al. 1997).

Mit der oben beschriebenen Bibliothek wurde das Screening gegen das EGP2-Oberflächenantigen wieder aufgenommen. Als Antigen präsentierende Zelllinie diente wiederum die mit EGP 2 transformierte DA 3 Zelllinie, die schon bei den Screeningversuchen mit der fünfzig Spenderbibliothek verwendet wurde. Die Zellen wurden diesmal allerdings mit 2% Paraformaldehyd fixiert um sie leichter handhaben zu können. Die transformierte Zelllinie wurde wieder im Verhältnis 1:10 (10^5 EGP2 Zellen mit 10^6 DA3 Zellen) mit der

Wildtyp Zelllinie vermischt. Sortiert wurden die Zellen diesmal mit einem FACS-Calibur mit Sortmodul der Firma Becton Dickinson.

Der FACS-Calibur verwendet ein mechanisches Verfahren zum Sortieren der Zellen, in Gegensatz zu einem Hochleistungssorter bei den der Flüssigkeitsstrom elektrostatisch aufgeladen wird. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist aber, daß es zu hohen Flüssigkeitsmengen kommt. Deshalb bietet das Gerät zwei unterschiedliche Sortverfahren. Beim einen wird der Flüssigkeitsstrom über einen Filter geleitet, der die sortierten Zellen zurückhält und so das Volumen, in dem sich die sortierten Zellen befinden, auf etwa 1ml reduziert. Beim anderen ist es möglich, die gemessenen Zellen direkt in ein 50ml Gefäß zu sortieren, mit dem Nachteil, daß sich relativ wenige Zellen (etwa 50000) in 50ml Flüssigkeit befinden, aus der sie dann abzentrifugiert werden können. Beide Verfahren schienen sich für das Zelloberflächenscreening, beim dem 20000 Zellen sortiert werden sollen, zu eignen und wurden ausprobiert. Dabei zeigt sich, daß der „Sort“ über den Filter besser geeignet war, da hier die Verluste an Zellen geringer war als beim Sortieren in ein 50ml Gefäß. Bei der Verwendung eines Filters werden die Zellen zudem permanent gewaschen und die Selektionsbedingungen für Phagen damit stringenter.

Die oben beschriebene Mischung der Zelllinien wurde mit 10^{11} Phagen 2h inkubiert, dreimal mit PBST gewaschen und im FACS gemessen. Es wurden jeweils 20000 Zellen sortiert, die Phagen eluiert und *E.coli* XL1-Blue Bakterien damit infiziert. Der Phagentiter wurde bestimmt und die verpackten Phagen in einer zweiten Selektionsrunde eingesetzt. Beim Verpacken gab es diesmal keine Probleme. Der Elutionstiter der zweiten Runde stieg leicht an von 1033 Klone der ersten Runde auf 2050 Klone in der zweiten Runde. Von dieser zweiten Runde wurden 96 Klone gepickt und in einen ECL-Phagen-ELISA auf ihre Bindung an die beiden Zelllinien hin untersucht. Da mit dem neuen Vektor pEXHAM1 direkt scFv-Fragment produziert werden, können die Überstände einer Übernachtskultur direkt verwendet werden.

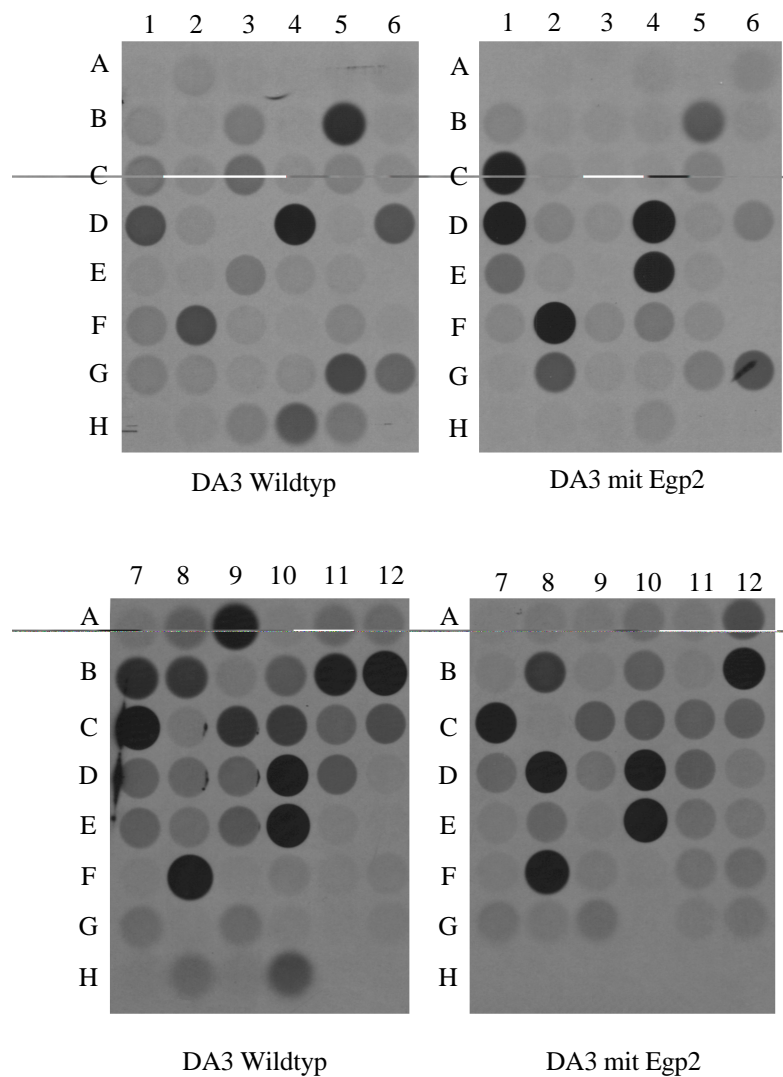


Abbildung 24: ECL-ELISA von 96 Klonen die nach der zweiten Screeningrunde gepickt wurden. ScFv-Fragmente wurden mit anti-c-myc und Ziege-anti-Maus-HRP gefärbt. Die scFv-Antikörper wurde mit einem Maus monoklonalen Antikörper gegen c-myc (9E10, Dianova) 1:2000 und dem Detektionsantikörper 1:5000 nachgewiesen. Belichtungszeit der Filme: 5min

Im oben dargestellten ECL-ELISA zeigen einige Einzelklone positive Reaktionen mit der transformierten DA3 Zelllinie. Die fünf positiven Klone (C1, D1, E4, F2, und D8) sowie einige negative Klone (B5, B12 und D4) wurden in einem Western Blot auf Expression untersucht.

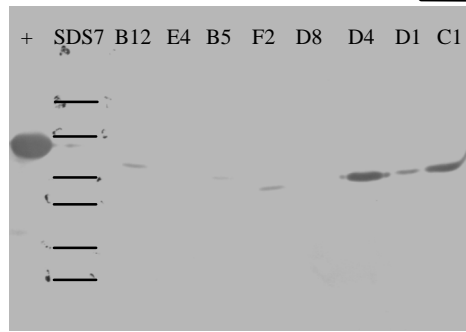


Abbildung 26: Western Blot einer SDS-Page, aufgetragen wurden je 10µl des Mediumüberstandes einer Übernachtskultur 1:1 mit SDS Probenpuffer gemischt. + ist die positiv Kontrolle (HBV-scFv Klon C9). Die Färbung erfolgte wie im oben gezeigten ECL-ELISA.

Alle Klone außer E4 und D8 exprimierten einen lösliches scFv-Fragment (teilweise in der Abbildung schlecht zu erkennen). C1 und D4 werden am stärksten exprimiert. Von allen im Western Blot getesteten Klonen wurden Periplasmapräparationen hergestellt und in einer FACS-Analyse auf ihre Bindung an die transformierte DA3 Zelllinie, sowie an die Wildtypzelllinie getestet. Die dabei gemessenen Bindungen waren leider sehr schwach. B12 + B5 binden in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem ECL-ELISA stärker an die Wildtypzelllinie. D1 bindet an beide Zelllinien gleichmäßig schwach. F2 bindet ganz schwach an die Transformante D4 + D8 zeigte keinerlei Bindung im FACS. C1 hatte die besten Bindungseigenschaften an die Transformante im FACS Abbildung 27.

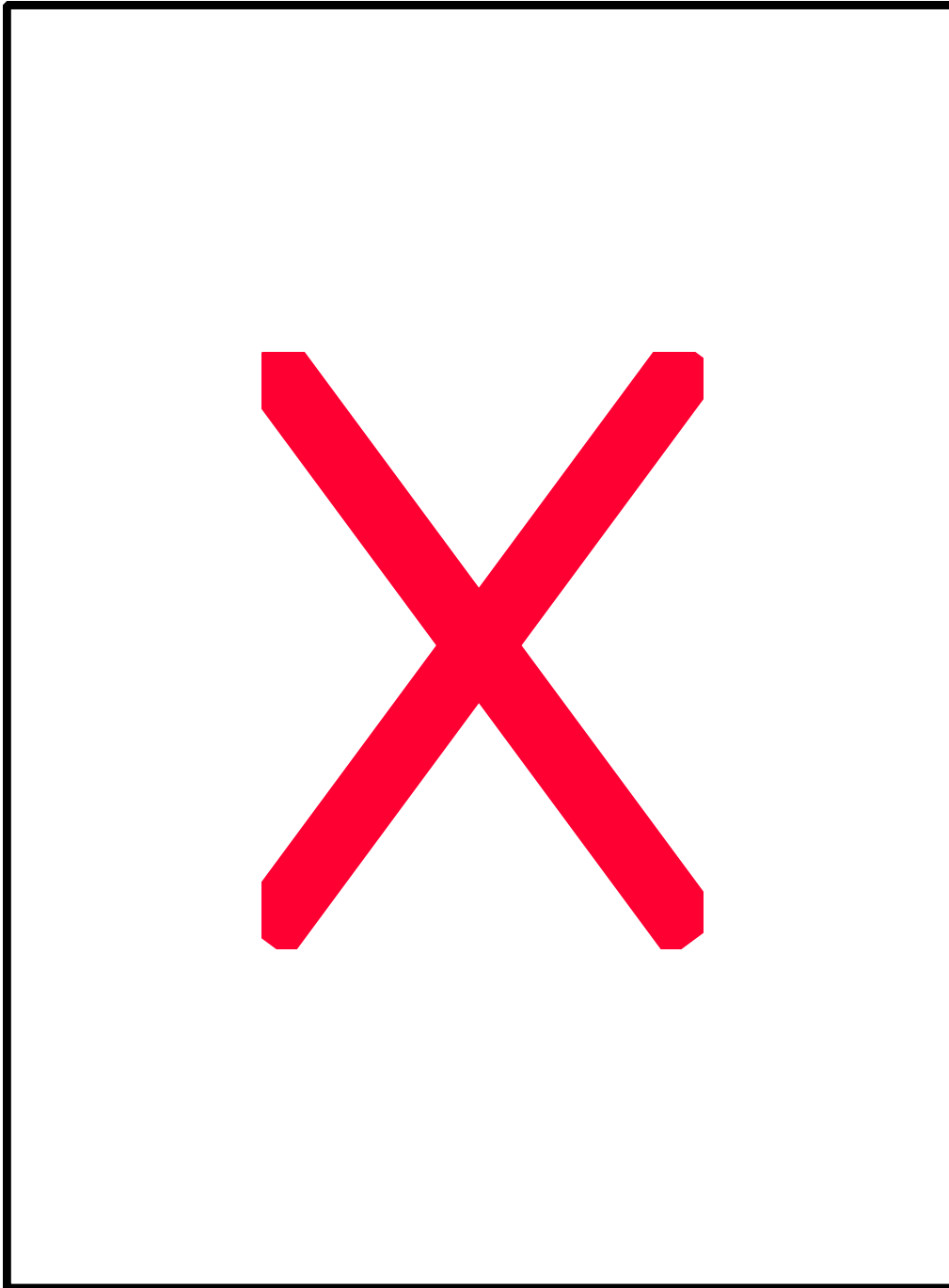


Abbildung 27: Tests der Bindungseigenschaften der Periplasmapräparation (PPP) im FACS. Zellen mit 100µl eines PPP aus 5ml Induktionskultur gefärbt. Bild 1: Der rote Kreis enthält die gemessenen Zellen. Bild 2: Histogramm des FITC-Kanals; nicht transfizierte Zellen. Bild 3. Gleicher Auswahlbereich wie bei Bild 1 für die EGP2 transfizierten Zellen. Bild 4: Histogramm des FITC-Kanals PPP auf transfizierten Zellen. Bild 5 Überlagerungs Darstellung Egp 2 transfizierte Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (1+2 AK). Bild 6: Überlagerungsdarstellung der Negativkontrolle (rote Kurve), PPP auf nicht transfizierten Zellen (gelbe Kurve) und PPP auf transfizierten Zellen. Der Nachweis des scFv-Antikörpers erfolgt mit einem anti-Histidin-Antikörpers Konzentration 1:100. Der Antikörper war direkt mit FITC gekoppelt.

Der PPP bindet spezifisch die transfizierten Zellen. Allerdings scheint die Affinität nicht besonders hoch zu sein, da es sich nur um eine kleine Verschiebung von einer halben Dekade handelt.

Kurz vor Ende dieser Arbeit erhielt unser Labor aufgereinigtes EGP2 Antigen von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dorothy Herlin. Dieses wurde in einem TMB-ELISA als Antigen eingesetzt und die gefundenen scFv-Fragmente darauf getestet. Der Klon C1 erkannte das Antigen, aber das Signal war sehr schwach mit OD₆₅₅ von 0,154, die anderen getesteten Klone lagen noch darunter mit ca. 0,100.

Die Bibliothek wurde in der Zwischenzeit mit weiteren Proteinantigene gescreent. Auch bei diesen Screeningversuchen konnten erfolgreich Antikörper gegen verschiedene Antigene isoliert werden (pers. Mit. Dr. Peter Röttgen).

VII Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation wurden mehrere Teilaspekte des Screenings von Antikörperbibliotheken und deren Herstellung untersucht. Beim Screening wurde versucht scFv-Antikörper gegen Oberflächenproteine zu gewinnen und bei der Herstellung wurde durch verschiedene methodische Änderungen versucht, eine Verringerung der nicht funktionellen scFv-Fragmente in einer Bibliothek zu erreichen.

Zu Beginn der Dissertations stand im Labor von Herrn Prof. Little eine große Phagen Bibliothek, die aus den peripheren Blutlymphozyten von fünfzig Spendern kloniert wurde, kurz vor ihrer Fertigstellung (Little, Welsch et al. 1999). Diese Bibliothek sollte mit Hilfe einer ebenfalls in der Arbeitsgruppe Little neu entwickelten Methode gegen Oberflächenantigene gescreent werden. Zu diesem Zeitpunkt war es bereits gelungen scFv-Antikörper gegen Haptene aus dieser Bibliothek zu gewinnen. Als nächstes sollte versucht werden scFv-Antikörper gegen größere Moleküle wie Peptide oder Proteine zu isolieren.

7.1 Screening der fünfzig Spender Bibliothek gegen Oberflächenantigene

7.1.1 Screening mit ELISA-Platten

Hierzu wurde zunächst die im Labor entwickelte Methode des „whole cell screenings“ mit ELISA-Platten verwendet. In einem Modellscreening von Dr. Stephanie Schmidt konnte zuvor gezeigt werden, daß man Zellen auf einer ELISA-Platte fixieren und als Antigen verwenden kann. Als Modelbibliothek wurde eine Mischung von anti-CD5- und anti-PhOx-Phagen verwendet. Es konnte gezeigt werden, daß nach zwei Runden eine Anreicherung von anti-CD5-Phagen möglich ist (Schmidt 1997).

Zunächst wurde diese Methode mit transfizierten Mausfibroblastenzelllinien ausprobiert. Es zeigt sich aber in ELISA-Tests, daß es nicht möglich war, durch Trypsin/EDTA-Inkubation von der Kulturschale abgelöste, adhärente Zellen, dauerhaft auf der ELISA-Platte zu verankern. Vermutlich werden durch die Trypsin/EDTA-Behandlung zu viele Adhäsionsmoleküle zerstört, so daß die Zellen, nicht mehr an die mit Concanavalin A beschichtete ELISA-Platte binden und deshalb auch durch die spätere milde Glutaraldehydfixierung nicht mit ihr vernetzt werden können. Ein Verzicht auf Trypsin brachte ebenfalls nicht den gewünschten Erfolg, so daß dazu übergegangen wurde, die Zellen direkt in ELISA-Platten wachsen zu lassen und sie nach mehrmaligen Waschen anschließend direkt zu fixieren. Dies war insofern erfolgreich, als sich die Zellen nun nicht mehr von der

ELISA-Platte lösen, bei den folgenden stringenten Waschschritten des Screenings nicht mehr von der ELISA-Platte lösen. Allerdings waren die Phagenelutionstitern bereits nach der ersten Runde der Selektion auf Zellen mit 10^{7-8} viel zu hoch. Gegen so einen hohen Anteil an „unspezifisch“ binden Phagen kann man nichts mehr anreichern, da die pro Runde erhaltenen Phagen (10^{7-8}) nur um etwa den Faktor 1000-10000 unter der eingesetzten Phagenmenge und nur um den 10-100 Faktor unter der angenommenen Komplexität liegen. Auf Grund der Affinität, der Expression oder der Faltung der einzelnen Antikörpern, ist davon auszugehen, daß pro Antigen 1-20 verschiedene bindende Phagenklone in der Gesamtbibliothek vorhanden sind. Die eingesetzte Phagemischung enthält demnach 10^{2-3} Kopien aller bindenden Phagen. Von diesen dürften sich bestenfalls fünfzig Prozent eluieren lassen, also maximal 500 Klone in 10^7 . Nach erneuter Verpackung stehen $5 \cdot 10^6$ spezifisch bindende Phagen unter 10^{11} zur Verfügung. Falls all diese Klone gebunden werden können, läßt sich rein rechnerisch eine Anreicherung über den Hintergrund in der dritten Runde erzielen. Vermutlich werden jedoch die Mehrzahl der Epitope durch die unspezifischen Phagen blockiert. Außerdem besteht eine große Wahrscheinlichkeit, daß die spezifischen Klone beim Verpacken Wachstumsnachteile haben.

Alle Versuche diesen Hintergrund auf den verwendeten Zelllinien zu senken, z.B. durch den Einsatz anderer Blockierungssubstanzen oder längerer Präadsorption der Phagenbibliothek auf den nicht transformierten Zellen bzw. auf Zellen, die mit einem anderen Antigen transfiziert waren, blieben ohne Erfolg. Mögliche Ursachen dürften in der Beschaffenheit solcher scFv-Antikörperbibliotheken liegen, z.B. ist ein Teil der scFv-Fragmente sicherlich falsch gefaltet und sind somit stark hydrophob, was unspezifisches Binden fördert. Außerdem sind die schwere und die leichte Kette neu kombiniert worden und passen somit eventuell nicht zueinander, was ebenfalls zu Faltungsproblemen führt. (Knappik and Pluckthun 1995; Martineau, Jones et al. 1998; Martineau and Betton 1999).

Durch Verwendung eines FACSsorter sollte das Problem der hohen Anzahl an unspezifisch bindenden Phagen reduziert werden. Die Zellen befinden sich bei diesem Verfahren in einem Flüssigkeitsstrom und werden einzeln sortiert, so daß nur Phagen die an eine Zelle gebunden haben selektioniert werden.

7.1.2 Screening mit einem FACSsorter

Die Screeningsversuche verliefen recht vielversprechend, der Hintergrund an Klonen konnte reduziert werden. Es wurden pro Screeningansatz nur 500-3000 pro 10000 sortierten Zellen

erhalten. Diese Anzahl entsprach der, die in der Literatur beschrieben wurde (de Kruif, Terstappen et al. 1995; Lekkerkerker and Logtenberg 1999). Allerdings kam es zu Problemen bei der Verpackung der isolierten Klone der ersten Runde. Die Bakteriensuspension wuchs lediglich bis zu einer OD₅₉₅ von 0,2-0,4 und brach dann zusammen, so daß auf eine zweite Runde verzichtet werden mußte, und somit nur Klone aus der ersten Runde zur Verfügung standen. Da die Phagentiter und somit die Anzahl der Phagen nicht so hoch war (500-1000), bestand eine gute Chance beim Analysieren von 96 Klonen einen „Binder“ zu finden. Im normalen Phagen-ELISA der TMB als Substrat verwendet, konnte aber keine deutliche, reproduzierbare Bindung festgestellt werden. Dies kann zum einen an der zu geringen Präsenz des betreffenden Antigens auf der Zelloberfläche, an einer schlechten Expression, der im ELISA-Plattenmaßstab verpackten Einzelklone oder an einer zu schwachen Affinität der scFv-Fragmente zum Antigen liegen. Deshalb wurde über ein neues sensitiveres ELISA-System nachgedacht. Hierfür schien ein auf Chemolumineszenz beruhendes sehr sensitives ELISA-System geeignet.

7.1.3 Das ECL-ELISA-System

Mit der Etablierung eines ECL-ELISA-Systems gelang es die Detektionsgrenze im Phagen-ELISA nach unten zu verschieben. Es konnte gezeigt werden, daß es nicht zu unspezifischen Kreuzreaktionen zwischen den eingesetzten Antikörpern und dem Antigen kommt. Die Detektionsgrenze bei einem ECL-Phagen-ELISA ist um das 100-1000fache höher, als bei einem Phagen-ELISA der TMB als Substrat verwendet. Bei einem mit TMB als Substrat durchgeführten ELISA liegt die Detektionsgrenze etwa bei 10^7 - 10^9 Phagen, je nach Affinität des scFv Antikörpers zum Antigen, wohingegen beim ECL-ELISA 10^5 Phagen gerade noch bei der 1:2000 Verdünnung erkannt wurden. Die 10^6 Verdünnung hingegen wurde unabhängig von der Konzentration des Zweitantikörpers in allen Verdünnungsstufen erkannt. Damit ist es gelungen ein sehr sensitives Nachweissystem für Antikörper-Antigen Wechselwirkungen zu etablieren bzw. geringe Mengen an z.B. scFv-Antikörpern zu detektieren. Die Nachweisgrenze ließe sich noch weiter nach unten senken durch die Verwendung eines noch empfindlicheren ECL-Substrates (Ultra-Signal, Pierce ca. 100 fach empfindlicher), dies erschien aber als nicht so sinnvoll, da dann bereits kleinste Mengen an unspezifisch bindenden Phagen zu Signalen führen würden. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten ECL-ELISA wurde somit stets das etwas unempfindlichere Substrat SuperSignal (Firma Pierce) verwendet.

7.1.4 Analyse der im FACSSort erhaltenen Klone durch einen ECL-ELISA, Westernblot, Plattenscreen und Restriktionsverdau

Alle bislang isolierten und verpackten Einzelklone wurden mit dem neuen ELISA-System erneut analysiert. Hierbei zeigten einige der Klone positive Reaktionen mit der transformierten Zelllinie. Beim erneuten Verpacken der Phagenüberstände für diesen Test lysierten wiederum einzelne Minikulturen, während sich andere normal verpacken ließen. Durch Plaquetest wurde heraus gefunden, daß sowohl die Einzelklonverpackungen, als auch die einzelnen Screeningrunden, sowie die Gesamtbibliothek mit weiteren unerwünschten Phagen kontaminiert war. Bei der Kontamination handelte es sich um eine Vielzahl an verschiedenen Phagen unter anderem um T Phagen. Durch Plaquetests war es möglich, infizierte Subbibliotheken zu identifizieren und sie aus der Gesamtbibliothek zu entfernen. Eine Phagenart, hierbei handelt es sich vermutlich um einen gentechnisch veränderten Lambda Phagen, konnte aber auch durch diese Tests, nicht entfernt werden. Er trat immer wieder, auch in zuvor negativ getesteten Subbibliotheken auf.

Es konnte lediglich versucht werden, daß er in möglichst geringer Anzahl in der zum Screening benutzten Bibliothek vorhanden war. Die meisten der verbleibenden kontaminierenden Phagen werden während des Screenings gewaschen. Jedoch stört die Kontamination um so mehr, je geringer die Stringenz während des Screenings ist, wie z.B. beim Screening auf Zellen.

Zu weiteren Schwierigkeiten kam es beim Umklonieren der im ECL-Phagen-ELISA positiv reagierenden Klone. Der *NcoI/NotI* Restriktionsverdau, der zum Klonieren der Expressionskassette in pHOG 21 nötig ist, zeigte, daß 10-40% der Einzelklone eine zu kurze Expressionskassette hatten (Abb. 3). Diesem Umstand wurde zu dem Zeitpunkt noch keine besondere Bedeutung beigemessen. Es wurde angenommen, daß es sich um eine zufällige Anreicherung von Artefakten handelt, was sich vielleicht auf die Screeningbedingungen zurückführen läßt. Später aber zeigte sich, daß interne Schnittstellen in den Immunglobulinketten die Ursache für die verkürzten Fragmente waren und sich durch eine andere Klonierungsstrategie vermeiden lassen.

Auch die Expressionsanalysen verliefen nicht wie zu erwarten. Nur bei wenigen Klone (4/15) konnte im Western Blot ein Protein mit der richtigen Größe eines scFv-Fragmentes nachgewiesen werden (Tab.1). Auf Grund dieser schlechten Expressionsergebnisse wurden einige Klone sequenziert, dabei wurde festgestellt, daß eine Vielzahl der Klone Mutationen in den Primersequenzen besaßen, die zu Leserasterverschiebungen oder zu Stop-Codons führten.

Der Grund für diese hohe Fehlerrate bei der Oligonukleotidherstellung liegt in der unterschiedlichen Prozentigkeit der Nukleotidmischungen an den einzelnen Positionen, da außer bei einer 50 prozentigen Mischung zweier Nukleotide die Synthesemaschine abgestellt werden muß und die Nukleotidemischung von Hand zugegeben werden. Hierbei kommt es vermutlich zu einer erhöhten Rate an Fehlern (pers Mitteilung Wolfgang Weinig, DKFZ).

Befinden sich in einer Bibliothek viele unvollständige Antikörper besteht eine hohe Chance diese anzureichern, da sie einen Wachstumsvorteil in den Wirtsbakterien haben. Es konnte gezeigt werden, daß dieses Problem dadurch vermindert werden kann, daß man sehr stringente Elutionsbedingungen wählt (30min)(de Bruin, Spelt et al. 1999).

Diese Elutionsbedingungen sind aber nur bei fixierten Zellen möglich, da nicht fixierte Zellen lysieren würden. Außerdem ist eine so lange Inkubation der Phagen in Triethylamin schädlich für die Infektiösität. Bereits nach 5min Elutiondauer nimmt die Infektiösität deutlich ab (Braunagel 1995).

Die oben dargestellte Problematik trat auch bei anderen Screeningversuchen auf, allerdings konnten hierbei neben nicht funktionellen scFv-Fragmenten auch bindende vollständige Antikörper isoliert werden z.B. gegen verschiedene Haptene (Hormone) oder Peptide (Little, Welschhof et al. 1999).

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde in der Arbeitsgruppe beschlossen, eine neue Bibliothek mit neuen Primern und verbesserten Klonierungsstrategien zu erstellen 6.5. Da die Herstellung einer Bibliothek mindestens ein Jahr in Anspruch nehmen würde, wurde bis zur Fertigstellung der neuen Bibliothek, die alte Bibliothek gegen aufgereinigte HBV-Antigene gescreent 6.4. Bei diesem Ansatz bestand eine größere Chance auf Erfolg, da bei dieser Methode Plastikröhrchen benutzt werden. Sie besitzen eine glatte Oberfläche und sind mit nur einem Antigen beschichtet, so daß die Möglichkeit einer unspezifischen Bindung von Phagen reduziert ist. Außerdem können solche Röhrchen viel stringenter gewaschen werden, was ebenfalls unspezifische Bindung reduziert.

7.2 Antikörper gegen HBV-Antigene

Das Screening der fünfzig Spender Bibliothek gegen HBV-Antigene verlief erfolgreich. Gegen zwei, der drei zum Screening eingesetzten Antigene, wurde eine Anreicherung erzielt. Hierbei handelte es sich um rekombinat hergestelltes preS1 , sowie aufgereinigtes L-Protein. Mit den beiden Proteinen wurde eine gute Anreicherung mit eluierten Phagentiter von $>10^7$ (L-Protein) bzw. $>10^5$ (preS1) erzielt. Der eluierte Phagentiter von 10^4 beim preS1/2-Antigen,

läßt auf keine spezifische Anreicherung schließen. Aufgrund der oben dargestellten Probleme mit der Bibliothek, wurde auf einen Phagen-ELISA verzichtet und die DNA für die scFv-Fragmente aus der angereicherten Bakterienpopulation isoliert. Die durch *NcoI/NotI* Restriktionsverdau erhaltene Expressionskassette wurde dann als polyklonale DNA in den Expressionsvektor pHOG21 kloniert. Hierdurch sollte Zeit eingespart werden und langwierige Phagen-ELISA, die vielleicht zu keinem funktionsfähigen scFv-Antikörper führen, eingespart werden. Es wurde schon öfters beobachtet, daß ein scFv-Antikörper spezifisch das jeweilige Antigen erkannte, solange er auf einem Phagen präsentiert wurde, er das aber in löslicher Form, also ohne pIII nicht tat. (persönliche Mitteilung, Petra Rohrbach, Dr. Stephanie Schmidt).

Die anschließenden Plattenscreens bestätigten eine solche Vorgehensweise. Es zeigte sich nämlich, daß im Falle des preS1 bzw. preS1/2 Screenings nur noch wenige funktionelle scFv-Antikörper übrig waren. Keiner dieser scFv-Antikörper zeigte im ELISA eine Bindung. Möglicherweise wurden beim preS1 Screening auch wieder ein oder mehrere Klone angereichert, die auf Grund von Deletionen eine verkürzte Expressionkassette besaßen und somit einen Wachstumsvorteil hatten. In Restriktionsanalysen wurden verkürzte Formen gefunden (Daten nicht gezeigt). Die Mehrzahl solcher Klone lassen sich, wegen einer oder mehrerer fehlender Restriktionsschnittstellen, nicht umklonieren und sind im Plattenscreen, somit auch nicht sichtbar. Bei dem verbleibenden Rest handelt es sich möglicherweise um nicht funktionelle scFv-Fragmente. Dies könnte erklären warum trotz Anreicherung keine Expression gefunden wurde.

Gegen PreS1/2 konnte nichts angereichert werden, und auch hier zeigten nur wenige umklonierte Klone im Plattenscreen eine scFv-Expression. Das Screening gegen das HBV L-Protein war erfolgreich, hier zeigten fast alle umklonierten Klone eine Expression im Plattenscreen

Die zehn Klone, welche nach einem Phagen-ELISA ausgewählt und näher untersucht wurden, erkannten sowohl das Screening Antigen (L-Protein), als auch rekombinantes s Antigen. Das bedeutet, daß sie gegen den HBsAg Anteil des L-Proteins gerichtet sind. Dies ist nicht verwunderlich, da mit ihm auch immunisiert wird. Bei den Spendern, die für die Bibliothek benutzt wurden, handelte es sich zu großem Teil um Personen die in einem Labor arbeiten, so daß davon auszugehen ist, daß einige davon gegen HBV immunisiert wurden. Auch die Sequenzierungsdaten stützen dieses, da beide scFv-Fragmente eine IgG spezifische 3' Primersequenz beinhalten. Dies ist das erste Mal, daß ein scFv-Fragment, das vermutlich von einem IgG-Antikörper stammt, aus dieser Bibliothek gewonnen werden konnte. Mit 100%iger

Sicherheit kann das nicht belegt werden, da die scFv-Fragmente außer der unterschiedlichen Primersequenz (Position 115-121) nur noch ein paar Basenpaare der CH1 Region besitzen, die bei IgM und IgG Antikörpern identisch ist. Somit läßt es sich nicht ganz ausschließen, daß der IgG-Primer auf einer IgM cDNA hybridisiert haben könnte.

Die beiden scFv-Fragmente wurden durch FPLC erfolgreich aufgereinigt. Dabei wurden sehr hohe Ausbeuten an funktionellem Protein erhalten. Insbesondere das als C9 bezeichnete scFv-Fragment wird in sehr großen Mengen produziert. Dabei handelt es sich um die höchsten Ausbeuten an scFv aus Periplasmapräparationen aus einem Liter Induktionsmedium, die in unserem Labor exprimiert wurden. Die Ausbeute mit 25mg/l aus dem Bakterienpellet und einer OD von 1,5-1,8 ist fast so hoch wie bei speziell mutierten und auf hohe Expression selektionierten scFv-Fragmenten (Martineau, Jones et al. 1998). Dabei wurden zwar höhere Ausbeuten 500mg/l erzielt, allerdings bei einer fast vierfach höheren OD₆₀₀ von 5,5 und unter Verwendung des Überstandes.

Es konnte zudem gezeigt werden, daß die scFv-Fragmente sowohl aufgereinigtes L-Protein, als auch rekombinantes HbsAg, sowie native Viruspartikel erkennen. Im ELISA mit HBV positivem Mausserum zeigten sie eine signifikante Bindung. Die absoluten Absorptionswerte sind niedriger als bei der Positivkontrolle mit polyklonalem anti-HbsAg Schafserum. Das mag daran liegen, daß scFv-Fragmente im Gegensatz zu vollständigen Antikörpern nur eine Bindungsstelle und keinen Fc-Teil besitzen; dadurch ist die Signalverstärkung im ELISA geringer.

7.3 Aufbau einer neuen scFv-Bibliothek aus Milzgewebe

Zum Aufbau einer scFv-Bibliothek werden Primer benötigt, die möglichst alle variablen Genregionen des Immunglobulinenrepertoires amplifizieren. Die bisher im Labor verwendeten Primer verfügen alle über variable Positionen. Bei der Synthese der Primer sind solche Positionen mögliche Fehlerquellen, wie herausgefunden wurde (Little, Welsch et al. 1999), da bei allen Nukleotidmischungen, bis auf eine 1:1 Mischung, die Synthesemaschine angehalten werden muß und die Nukleotidmischung von Hand zugegeben werden muß (Pers. Mitteilung Wolfgang Weinig, DKFZ, Heidelberg). Die „wobble“ Positionen in den Primern wurden verwendet, um Primer und PCR Reaktionen zu sparen. Praktisch alle veröffentlichten Primersätze verfügen deshalb über mindestens eine „wobble“ Position in den Primern.

Der für die fünfzig Spender Bibliothek verwandte Primersatz verfügt sogar über bis zu 5 variable Positionen pro Primer und damit über ein hohes Risiko, daß eine Teilmenge des

Primers nicht korrekt synthetisiert wird. Zudem führt er Aminosäurekombinationen ein, die es nicht in den Immunglobulinen gibt. Deshalb wurde ein Primersatz entwickelt, der über keine variablen Positionen verfügt, der die *E.coli* Aminosäurekodierung verwendet und der alle bekannten variablen Immunglobulingene amplifiziert (Tomlinson 1997; John Wiley & Sons 1999).

Alle 52 verwendeten 5' Primer sind in der Lage, in Kombination mit einem IgM 3' Primer ein spezifisches 400bp Produkt zu amplifizieren. Die Produktmengen variieren allerdings sehr stark von einer Primerkombination zur anderen. Eine Ursache dafür ist die unterschiedliche Präsenz der einzelnen Subgruppen in der cDNA (Cox, Tomlinson et al. 1994; Brezinschek, Brezinschek et al. 1995; Foster, Brezinschek et al. 1997). Durch die relative niedrige Hybridisierungstemperatur (55°C) und die damit verbundene geringere Spezifität der Primer kann nicht ausgeschlossen werden, daß Primerpaare nicht nur ihre Subgruppe amplifizieren sondern auch Sequenzen aus verwandten Subgruppen. Von einer höheren Hybridisierungstemperatur wurde jedoch abgesehen, da es sich bei einer IgM Bibliothek um eine möglichst universelle Bibliothek handelt und es deshalb nicht stört, wenn andere nicht klassenspezifische Immunglobulinketten amplifiziert werden. Das Muster an schwachen und starken Banden in der ersten PCR, entspricht etwa der Frequenz, mit der die humanen Immunglobulinfamilien *in vivo* benutzt werden (Demaison, David et al. 1995). Diese Unterschiede sollten später auch in der Bibliothek zu sehen sein, d.h. eine im Menschen selten benutzte Subfamilie sollte auch rarer in der scFv-Bibliothek sein. Deshalb wurde nicht versucht, die Produktmenge durch Modifikationen der PCR-Bedingungen zu steigern.

Um die PCR-Produkte klonieren zu können, mußten sie noch einmal reamplifiziert und mit Restriktionsschnittstellen versehen werden. Als Restriktionsschnittstellen wurden dieselben benutzt, die auch schon zur Herstellung anderer Bibliotheken benutzt worden waren. Obwohl einige der Restriktionsschnittstellen in den humanen Immunglobulinen schneiden (*Hind* III z.B. schneidet einmal in den VH Genen bzw. zweimal in V λ Genen einer Subpopulation, und *Nco* I schneidet einmal den VH Genen einer Subpopulation), wurden diese Restriktionsschnittstellen und nicht etwa *Sfi* I benutzt, um eine Kompatibilität mit den alten Bibliotheken zu gewährleisten (Little, Welschof et al. 1999; Welschof et al. 1996; Dorsam et al. 1997).

Bei der ersten, wie auch der zweiten PCR wurde darauf geachtet, daß möglich wenig kreuzkontaminierende Produkte entstehen, was auch bei beiden PCR's gelang. Bei fast allen Primerkombinationen wurde ein spezifisches 400bp großes Produkt amplifiziert, nur in einem Fall gab es eine Kreuzreaktion (V λ 7b).

Für den neuen 5' Primersatz wurde auch gleichzeitig ein klassenspezifischer 3'Primesatz entwickelt. Dieser ist aber nur sinnvoll einzusetzen, wenn er auch klassenspezifisch die einzelnen Immunglobulinklassen IgM, IgG, IgD, IgE und IgA amplifiziert. Um dies zu testen wurde eine Reihe von Primerspezifitätstest durchgeführt.

Mit allen 3' Primern konnte zunächst in einer ersten PCR ein Produkt der richtigen Größe (ca.400bp) amplifiziert werden. Allerdings erzeugt der IgEa Primer außer der gewünschten 400bp Bande noch zwei weitere Banden, die sich trotz Veränderung der PCR-Bedingungen nicht beseitigen ließen. Auch zwei neue Primer IgEb+c, die im gleichen konstanten Bereich der CH1 Domäne binden, jedoch um eine Aminosäure nach vorne bzw. zwei Aminosäuren nach hinten verschoben, konnten das Problem nicht vollständig lösen. Diese Ergebnisse wurden sowohl mit Blut cDNA als auch mit Milz cDNA erhalten.

In der zweiten PCR, bei der die erste als Template benutzt wurde und alle Primer wechselseitig ausprobiert wurden, konnte erfolgreich gezeigt werden, daß die Primer weitgehend spezifisch sind. Wird aus Blut gewonnene cDNA für die erste PCR verwendet, ist die zweite bei IgG, D, M und A klassenspezifisch. Lediglich die Versuche mit den IgE Primern waren nicht ganz spezifisch. Der IgEb Primer brachte hier das beste Ergebnis. Möglicherweise ist die Hybridisierungsstelle durch Sekundärstrukturen schlecht zugänglich, oder es befinden sich nur wenige IgE cDNA Sequenzen in der cDNA, was zu erwarten wäre, da es sich um gesunde Spender handelte. Beim Einsatz der Milz cDNA sind alle 3'Primer etwas unspezifischer, jedoch wird auch wesentlich mehr PCR-Produkt erhalten. Da sich in der Milz viele Antikörper sezernierende Plasmazellen befinden, ist es möglich, daß eine Subpopulation die cDNA dominiert und so zuviel DNA als Template eingesetzt wird. Hat erst einmal ein 3'Primer falsch hybridisiert, stimmt die Sequenz in der nächsten Runde zu 100% und wird weiter amplifiziert. Um das eingesetzte Template kontrollieren zu können, wurde deshalb die erste PCR noch einmal mit Ch1 Primern durchgeführt. Dadurch erhält man Fab Fragmente, deren CH1 Regionen spezifisch sind für die einzelnen Klassen. Durch einen Restriktionsverdau mit einem Enzym, das nur in einer Klasse scheidet, ließ sich feststellen, daß das Produkt der ersten PCR größtenteils klassenspezifisch ist. Lediglich ein kleiner Teil ließ sich nicht schneiden, hierbei könnte es sich um andere Klassen handeln, wahrscheinlicher aber ist, daß bei diesem Teil nur die Restriktionsschnittstelle in der PCR mutiert wurde. In der Regel muß unter den gewählten PCR-Bedingungen pro amplifizierten scFv-Fragment mit 1-6 Mutationen durch die PCR gerechnet werden (pers Mitteilung Dr. Peter Röttgen). Auch bei diesem Test scheiterten die Versuche mit den IgE Primern, da nicht genügend Produkt für einen Restriktionsverdau gewonnen werden konnte.

7.4 Aufbau einer scFv IgM-Bibliothek im modifizierten Expressionsvektor pEXHAM 1

Aus 2g Milzgewebe wurde jeweils die mRNA isoliert und nach Umschreibung dieser in cDNA das IgM Repertoire mit Hilfe des ersten und zweiten Primersatzes amplifiziert. Die Herstellung der Bibliothek erfolgte in zwei Stufen. Zuerst wurden VH-Subbibliotheken der einzelnen Spender herstellt. Dafür wurden die VH-Fragmente der zweiten PCR über die Restriktionschnittstellen *Nco* I und *Hind* III in pEXHAM 1 kloniert. Die fertige VH-Subbibliothek wurde dann durch Elektroporation in *E.coli* XL1-Blue eingeschleust. Für jede Subbibliothek wurde eine Mindestkomplexität von 10^6 angestrebt und auch erreicht. Die VH Kette wurde deshalb zuerst kloniert, da *Hind* III zweimal in der leichten Kette scheidet und es so bei einer Klonierung in eine VL Subbibliothek zu verkürzten Formen kommen kann. Danach wurde das amplifizierte $VL_{\lambda+\kappa}$ Repertoire in die Subbibliotheken kloniert und diese dann in *E.coli* transformiert. Es wurde versucht, bei der neuen Bibliothek verkürzte scFv-Fragmente unter allen Umständen zu verhindern, da solche Fragmente insbesondere unter wenig stringenten Bedingungen einen Selektionsvorteil haben (de Bruin, Spelt et al. 1999).

Der verwendete Vektor soll das spätere Screening erleichtern, da man hier auf Grund des Amber Stop Codons scFv-Fragmente im Überstand erhält. Auch andere Phagedisplayvektoren benutzen diese Prinzip (Hoogenboom, Griffiths et al. 1991). Dies funktioniert so gar direkt in *E.coli* XL1-Blue, da die Suppression nicht vollständig ist, so daß die Kulturüberstände direkt, ohne vorheriges Umklonieren in einem ELISA eingesetzt werden können.

Auf Grund des Umstandes, daß in der alten Bibliothek verkürzte scFv-Fragmente gefunden wurden, wurde ein Einzelklonrestriktionsverdau durchgeführt, um zu überprüfen, ob die einzelnen Ketten die richtige Größe besitzen. Dabei zeigte es sich, daß es noch nicht gelungen war verkürzte Fragmente zu vermeiden 6.8. Ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt vor der Klonierung der V_L Fragmente in die Subbibliotheken brachte den gewünschten Erfolg. Danach konnten keine verkürzten Fragmente mehr gefunden werden. Lediglich Klone mit internen *Nco*I Schnittstellen in der VH Kette wurden entdeckt. Bei diesen wurde eine interne Restriktionschnittstelle beim Restriktionsverdau nicht geschnitten, so daß einzelne Klone in der fertigen Bibliothek trotz Reinigung der Klonierungsfragmente noch eine interne Schnittstelle haben. Dies hat aber keinen Einfluß auf die Qualität der Bibliothek, sondern macht lediglich beim Umklonieren in andere Vektoren (z.B pHOG21) Probleme.

Nachdem von jedem Milzspender, sowie eines Blutspenders eine scFv-Bibliothek erstellt worden war wurden diese vereinigt und die daraus resultierende scFv Bibliothek mit einer

Komplexität von $2 \cdot 10^8$ erneut mit einem FACSSorter gegen Oberflächen Antigene gescreent, diesmal mit einem FACS-Calibur mit Sortmodul der Firma Becton Dickinson (Dieses Gerät stand uns leihweise zur Verfügung). Dieser FACSSorter verwendet ein mechanisches Verfahren zum Sortieren der Zellen, in Gegensatz zu dem vorher verwendeten Hochleistungssorter bei den der Flüssigkeitsstrom elektrostatisch aufgeladen wird. Es wurden zwei unterschiedliche Sortverfahren ausprobiert. Beim einen wurde der Flüssigkeitsstrom über einen Filter geleitet, der die sortierten Zellen zurückhielt.

Dieses Screeningverfahren brachte die meisten im ELISA positiven Klone (4). Beim anderen Verfahren wurde versucht, die Zellen direkt in ein 50ml Gefäß zu sortieren, mit dem Nachteil, daß sich relativ wenige Zellen (20000) in 25ml Flüssigkeit befanden, aus der sie dann abzentrifugiert werden mußten. Hierbei ist es vermutlich zu Verlusten gekommen, da sich nur ein positiver Klon im ECL-ELISA finden ließ. Bei der Verwendung eines Filters werden die Zellen zudem permanent gewaschen und die Selektionsbedingungen für Phagen damit stringenter.

Nach der Durchführung von zwei Screeningrunden wurden 96 Klone in einem ECL-ELISA getestet. Fünf Klone erkannten dabei spezifisch die transformierte Zelllinie. Bei zwei der Klone konnte kein scFv-Protein in Western Blot nachgewiesen werden. Möglicherweise sind die produzierten Mengen an scFv-Protein zu gering um sie im Western Bot zu detektieren. Ein ECL-ELISA ist 100 mal sensitiver, so daß auch kleinste Mengen detektiert werden können. Alle Periplasmapräparationen der Klone wurden zudem im FACS getestet. Hierbei zeigte ein Klon eine spezifische Bindung an die Egp2 Transformante. Die Affinität dieses Antikörpers C1 dürfte allerdings nicht allzu hoch sein, da das Signal nur um ca. eine halbe Dekade verschoben wurde. Dieser Antikörper wurde noch mit aufgereinigtem Egp2 Protein in einen normalen ELISA, der TMB als Substrat verwendet, getestet. Der Klon C1 erkannte das Antigen zwar, aber das Signal war sehr schwach, mit einer OD₆₅₅ von 0,154.

7.5 Ausblick

Die Bibliothek wurde in der Zwischenzeit auch mit verschiedenen anderen Antigenen gescreent. Dabei konnten erfolgreich Antikörper gegen verschiedene Proteinantigene isoliert werden (pers. Mit. Peter Rötgen).

Durch weitere Steigerung der Komplexität der Bibliothek ist es vielleicht möglich, Antikörper mit einer größeren Affinität zum Egp2-Antigen zu erhalten. Weiterhin könnte die Affinität des bereits isolierten Antikörpers durch eine sogenannte „Guided selection“ gesteigert werden. Dabei werden abwechselnd die schwere und die leichte Kette des Antikörpers durch eine Subbibliothek ersetzt und die daraus resultierende Bibliothek erneut mit dem Antigen gescreent.

Zudem könnte die Stringenz während des Sortierens durch den Einsatz von z.B. Detergenzien im FACS erhöht werden, um so auf höher affine Antikörper zu selektionieren.

Das „Framework“ des anti HbsAg scFv mit seiner sehr guten Expression in *E.coli* bietet eine Vielzahl an Möglichkeiten für die weitere Entwicklung. Derzeit wird das „Framework“ eines Antikörpers (C9) zum Aufbau einer synthetischen Bibliothek benutzt. Außerdem erkennt der Antikörper virale Partikel und ließe sich deshalb als Detektionsantikörper verwenden, der billig in *E.coli* in großen Mengen produziert werden kann.

Die beiden monoklonalen Antikörper können zudem für bispezifische Konstrukte oder Radioimmunokjugate benutzt werden, um Tumorzellen gezielt zu zerstören. Zwar besitzen nur 32% der primären Tumore das Antigen, da es aber kaum Therapiemöglichkeiten gibt, ist dies ein vielversprechender Ansatz. Auch eine Kopplung an Fluoreszenzfarbstoffe ist denkbar. Diese Konjugate könnten dann zur Kontrastierung von Tumoren eingesetzt werden, so daß die weitere Charakterisierung der Antikörper für die Zukunft eine Reihe von interessanten Perspektiven bietet.

VIII Zusammenfassung

Die Phagedisplaytechnologie ist in den letzten Jahren eine der wichtigsten Methoden zur Gewinnung von humanen monoklonalen Antikörpern geworden.

Die Herstellung von großen Antikörperbibliotheken mit Hilfe dieser Technik ist Voraussetzung für die erfolgreiche Selektion von Antikörpern gegen die unterschiedlichsten Antigene. Ziel der vorliegenden Arbeit war es sowohl große Antikörperbibliotheken erfolgreich Antikörper gegen Oberflächenantigene zu selektionieren, als auch die Methoden zu deren Bau zu verfeinern. Aus einer bestehenden Antikörperbibliothek, die aus den peripheren Blutlymphozyten von fünfzig Spendern aufgebaut worden war, wurden scFv-Fragmente gegen das HbsAg des HBV-Viruses isoliert. Die Fragmente erkennen sowohl rekombinant hergestelltes HbsAg, als auch natives auf dem Virus selbst. Diese scFv-Fragmente werden zudem in besonders großen Mengen in *E.coli* produziert, so daß das Framework für den Aufbau einer synthetischen Bibliothek geeignet ist.

Mit einem neuen sensitiveren Phagen-ELISA auf Chemolumineszenzbasis wurden die Detektionsgrenze nach unten verschoben. Dadurch ist es möglich bereits 10^6 gebundene Phagen zu detektieren. Dieses Verfahren ist besonders sinnvoll einzusetzen, wenn nicht genügend Antikörper oder Antigen vorhanden ist und hat großes diagnostisches Potential bei gering exprimierten Zelloberflächenantigenen.

Durch verschiedene methodische Änderungen bei der Amplifikation der humanen variablen Genregionen und bei der Herstellung von Phagedisplaybibliotheken gelang es, die Qualität solcher Bibliotheken zu steigern. Außerdem wurden durch umfangreiche Primerspezifitätstests die Grundlagen für klassenspezifische Patientenbibliotheken gelegt.

Desweiteren wurde unter Verwendung von neu entworfenen Primern eine universelle IgM Bibliothek hergestellt und diese erfolgreich mit einem Zelloberflächenantigen (Egp2) gescreent. Zur Selektion der scFv-Fragmente wurde ein FACSsorter verwendet. Bindungsstudien in FACS zeigten, daß der scFv-Antikörper sein Antigen in einer nativen Umgebung erkennt. Durch „Guided selection“ (abwechselnder Austausch der schweren und leichten Immunglobulinkette) läßt sich eine Affinitätssteigerung erzielen, so daß ein für die Tumorthapie vielversprechender „single chain“ Antikörper gewonnen wird.

IX Literaturverzeichnis

Alzari, P. M., M. B. Lascombe, et al. (1988). "Three-dimensional structure of antibodies." Annu Rev Immunol **6**: 555-80.

Behring, E. and S. Kitasato (1890). "Über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Tieren." Deutsche Medizinische Wochenschrift **49**: 1113-1114.

Bird, R. E., K. D. Hardman, et al. (1988). "Single-chain antigen-binding proteins [published erratum appears in Science 1989 Apr 28;244(4903):409]." Science **242**(4877): 423-426.

Braunagel, M. (1995). Konstruktion und Screening einer synthetischen Antikörperbibliothek, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.

Braunagel, M. and M. Little (1997). "Construction of a semisynthetic antibody library using trinucleotide oligos." Nucleic Acids Res **25**(22): 4690-1.

Brezinschek, H. P., R. I. Brezinschek, et al. (1995). "Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction." J Immunol **155**(1): 190-202.

Bullock, W. J., Fernandez, J. M., and Short, J. M. (1987). "A high efficiency plasmid transforming rec A *E.coli* strain with beta-galactosidase selection." Biotechniques **5**: 376-9.

Carson, D. A. and B. D. Freimark (1986). "Human lymphocyte hybridomas and monoclonal antibodies." Adv. Immunol. **38**: 275-311.

Choi, I. (1998). Herstellung eines rekombinanten IgM Antikörpers, Johan Wolfgang von Goethe-Universität Frankfurt.

Courtenay-Luck, N. S., A. A. Epenetos, et al. (1986). "Development of primary and secondary immune responses to mouse monoclonal antibodies used in the diagnosis and therapy of malignant neoplasms." Cancer Res **46**(12 Pt 1): 6489-93.

Cox, J. P., I. M. Tomlinson, et al. (1994). "A directory of human germ-line V kappa segments reveals a strong bias in their usage." Eur J Immunol **24**(4): 827-36.

de Bruin, R., K. Spelt, et al. (1999). "Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries." Nat Biotechnol **17**(4): 397-9.

de Kruif, J., L. Terstappen, et al. (1995). "Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(9): 3938-42.

Demaison, C., D. David, et al. (1995). "Analysis of human VH gene repertoire expression in peripheral CD19+ B cells." Immunogenetics **42**(5): 342-52.

Dorsam, H., P. Rohrbach, et al. (1997). "Antibodies to steroids from a small human naive IgM library." FEBS Lett **414**(1): 7-13.

Dotto, G. P., V. Enea, et al. (1981). "Functional analysis of bacteriophage f1 intergenic region." Virology **114**(2): 463-73.

Dower, W. J., J. F. Miller, et al. (1988). "High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation." Nucleic Acids Res **16**(13): 6127-45.

Dubel, S., F. Breitling, et al. (1993). "A family of vectors for surface display and production of antibodies." Gene **128**(1): 97-101.

Foster, S. J., H. P. Brezinschek, et al. (1997). "Molecular mechanisms and selective influences that shape the kappa gene repertoire of IgM+ B cells." J Clin Invest **99**(7): 1614-27.

Glassy, M. C. and R. O. Dillman (1988). "Molecular biotherapy with human monoclonal antibodies." Mol Biother **1**(1): 7-13.

Grossbard, M. L. (1998). Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer.

Gruber, R., L. J. van Haarlem, et al. (2000). "The human antimouse immunoglobulin response and the anti-idiotypic network have no influence on clinical outcome in patients with minimal residual colorectal cancer treated with monoclonal antibody CO17-1A." Cancer Res **60**(7): 1921-6.

Hoogenboom, H. R., A. D. Griffiths, et al. (1991). "Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains." Nucleic Acids Res **19**(15): 4133-7.

Hoogenboom, H. R., P. Henderikx, et al. (1998). "Creating and engineering human antibodies for immunotherapy." Adv Drug Deliv Rev **31**(1-2): 5-31.

Huse, W. D., L. Sastry, et al. (1989). "Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda [see comments]." Science **246**(4935): 1275-81.

Huston, J. S., D. Levinson, et al. (1988). "Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(16): 5879-5883.

Huston, J. S., M. Mudgett-Hunter, et al. (1991). "Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins." Methods Enzymol **203**: 46-88.

John Wiley & Sons, I. (1999). Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.

Kabat, E. A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S. und Foeller, C. (1991). Sequences of proteins of immunological interest, U.S. Department of Health and Human Services.

Kipriyanov, S. M., O. A. Kupriyanova, et al. (1996). "Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell- surface antigens by flow cytometry." J Immunol Methods **196**(1): 51-62.

Knappik, A., L. Ge, et al. (2000). "Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides." J Mol Biol **296**(1): 57-86.

Knappik, A. and A. Pluckthun (1995). "Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding." Protein Eng **8**(1): 81-9.

Köhler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature **256**: 495-497.

Kuzel, T. M. and S. T. Rosen (1994). "Antibodies in the treatment of human cancer." Curr Opin Oncol **6**(6): 622-6.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4." Nature **227**: 680-685.

Lamers, C. H., J. W. Gratama, et al. (1995). "Inhibition of bispecific monoclonal antibody (bsAb)-targeted cytolysis by human anti-mouse antibodies in ovarian carcinoma patients treated with bsAb-targeted activated T-lymphocytes." Int J Cancer **60**(4): 450-457.

Lekkerkerker, A. and T. Logtenberg (1999). "Phage antibodies against human dendritic cell subpopulations obtained by flow cytometry-based selection on freshly isolated cells." J Immunol Methods **231**(1-2): 53-63.

Little, M., M. Welschof, et al. (1999). "Generation of a large complex antibody library from multiple donors." J Immunol Methods **231**(1-2): 3-9.

Maloney, D. G., A. J. Grillo-Lopez, et al. (1997). "IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma." Blood **90**(6): 2188-95.

Marks, J. D., H. R. Hoogenboom, et al. (1991). "By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage." J Mol Biol **222**(3): 581-97.

Martineau, P. and J. M. Betton (1999). "In vitro folding and thermodynamic stability of an antibody fragment selected in vivo for high expression levels in Escherichia coli cytoplasm." J Mol Biol **292**(4): 921-9.

Martineau, P., P. Jones, et al. (1998). "Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm." J Mol Biol **280**(1): 117-27.

Milstein, C. (1994). "Monoclonal antibodies in hematology." Rev Invest Clin Suppl: 7-8.

Nadler, L. M., J. Ritz, et al. (1982). "Induction of human B cell antigens in non-T cell acute lymphoblastic leukemia." J Clin Invest **70**(2): 433-42.

Ratner, E. (1943). "Allergy anaphylaxis and immunotherapie." Willians and Wilkins, Baltimore.

Riethmuller, G., E. Holz, et al. (1998). "Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial." J Clin Oncol **16**(5): 1788-94.

Roovers, R. C., P. Henderikx, et al. (1998). "High-affinity recombinant phage antibodies to the pan-carcinoma marker epithelial glycoprotein-2 for tumour targeting." Br J Cancer **78**(11): 1407-16.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.

Schmidt, S. (1997). Methoden zur Klonierung und Aufreinigung von Zelloberflächenantigene aus Hybridomen am Beispiel von CD20 und CD28. Naturwissenschaftlich-Mathematische-Gesamtfakultät. Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität.

Schmidt, S., M. Braunagel, et al. (1999). "Selection of an anti-CD20, single-chain antibody by phage ELISA on fixed cells." Biotechniques **26**(4): 697-702.

Sheets, M. D., P. Amersdorfer, et al. (1998). "Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1999 Jan 19;96(2):795]." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6157-62.

Skerra, A. and A. Plückthun (1991). "Secretion and in vivo folding of the Fab fragment of the antibody McPC603 in Escherichia coli: influence of disulphides and cis-prolines." Protein Eng **4**(8): 971-979.

Skerra, A. and A. Plückthun (1988). "Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli." Science **240**: 1038-1040.

Steinberger, P., D. Kraft, et al. (1996). "Construction of a combinatorial IgE library from an allergic patient. Isolation and characterization of human IgE Fabs with specificity for the major timothy grass pollen allergen, Phl p 5." J Biol Chem **271**(18): 10967-72.

Tomlinson, I. (1997). **V-BASE** The database of human antibody genes, MRC Centre for Protein Engineering.

Tonegawa, S. (1983). "Somatic generation of antibody diversity." Nature **302**(5909): 575-81.

Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 4350-4354.

Wee, A., I. Yap, et al. (1991). "Hepatocyte hepatitis B surface antigen expression in chronic hepatitis B virus carriers in Singapore: correlation with viral replication and liver pathology." J Gastroenterol Hepatol **6**(5): 466-70.

Welschof, M. (1996). Antikörper-Expressionsbibliotheken in E.coli: Isolierung und Charakterisierung der Fv-Region von humanen Anti-(Fab')₂ Autoantikörper. Heidelberg.

Winter, G. and C. Milstein (1991). "Man-made antibodies." Nature **349**(6307): 293-9.

Zaccolo, M., S. Roggero, et al. (1992). "Generation of human monoclonal antibodies that confer protection against pertussis toxin." Infect Immun **60**(3): 1258-60.

Eigene Publikationsliste:

Dörsam H, Rohrbach P, Kürschner T, Kipriyanov S, Renner S, Braunagel M, Welschhof M, Little M. (1997): Antibodies to steroids from a small human naive IgM library. FEBS Lett. 414, 7-13.

Schmidt S, Braunagel M, Kürschner T, Little M (1999): Selection of an anti-CD20, single-chain antibody by phage ELISA on fixed cells. Biotechniques 697-702.

Little M, Welschhof M, Braunagel M, Hermes I, Christ C, Keller A, Rohrbach P, Kürschner T, Renner S, Kleist C, Terneß P. (1999): Generation of a large complex antibody library from multiple donors. JIM

Ingrid Choi, Concepción de Inés, Timo Kürschner, Vigdis Sörensen, Tove Olafsen, Björn Cochlovius, Inger Sandlie, Melvyn Little: Recombinant chimeric OKT3 scFv IgM antibodies mediate immune suppression while reducing T-cell activation *in vitro*. Eur J Immunol. (In press)

Humaner Antikörper gegen ein Fusionspolypeptid bzw. -protein, das einen Anteil von mindestens sechs Histidinen aufweist.

Patent: DE-C-197 28 697.6

X Anhang

10.1 Sequenz C9:

```

                                     NcoI
                                     |
aacCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCCATGGCG
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
ttgGATAACGGATGCCGTCGGCGACCGAACGACGACGACCGTCGAGTCGGCCGGTACCGC

a      N L L P T A A A G L L L L A A Q P A M A -

      CAGGTACAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
      GTCCATGTGACGTCCTCAGACCCCCTCCGCACCAGGTTCGGACCTCCAGGGACTCTGAG

a      Q V Q L Q E S G G G V V Q P G R S L R L -

      TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTAATTATGGCATACTACTGGGTCCGCCAGGCT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
      AGGACACGTCGGAGACCTAAGAGGAAGTCATTAATACCGTATGTGACCCAGGCGGTCCGA

a      S C A A S G F S F S N Y G I H W V R Q A -

      CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCACTTATATCATATGATGGAAATAAGAAATTCTAT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
      GGTCCGTTCCCCGACCTCACCCACCGTGAATATAGTATACTACCTTTATTTCTTTAAGATA

a      P G K G L E W V A L I S Y D G N K K F Y -

      GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTTCGCCATCTCCAGAGACACTTcTAAGAATACGGTGGAT
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
      CGTCTGAGGCACCTTCCCGGCTAAGCGGTAGAGGTCTCTGTGAAGATTCTTATGCCACCTA

a      A D S V K G R F A I S R D T S K N T V D -

      CTGCAAATGACCAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAAATCTGGG
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
      GACGTTTACTGGTTCGGACTCTGGACTCCTGTGCCGACATATAATGACACGCTTTAGACCC

a      L Q M T S L R P E D T A V Y Y C A K S G -

      GGTATTGCCTTGCTACTGGGGGGAATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
      CCATAACGGAACATGACCCCCCTTAAACTGATGACCCCGGTCCCTTGGGACCAGTGGCAG

a      G I A L Y W G E F D Y W G Q G T L V T V -

                                     HindIII                                     MluI
                                     |                                     |
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTA
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
AGGAGTCGGAGGTGGTTCCCGGGTTTCGAACCTTCTTCCACTTAAAAGTCTTCGTGCGCAT

a      S S A S T K G P K L E E G E F S E A R V -

```



```

TCCTATGAACTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGACGGCCATGATT
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
AGGATACTTGACTGAGTCGGTGGGAGCCACAGTCAACGGGGTCCTGTCTGCCGGTACTAA

a      S   Y   E   L   T   Q   P   P   S   V   S   V   A   P   G   Q   T   A   M   I   -

ACCTGTGGGGGAAACaACATTGGAAGTACAACCGTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
TGGACACCCCTTTGtTGTAACCTTCATGTTGGCACGTGACCATAGTCGTCTTCGGTCCG

a      T   C   G   G   N   N   I   G   S   T   T   V   H   W   Y   Q   Q   K   P   G   -

CAGGCCCCCTGTGCTGGTCTGCTATGATGATAACGAGCGACCCTCAGGGATCCCTGAGCGA
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
GTCCGGGGACACGACCAGCAGATACTACTATTGCTCGCTGGGAGTCCCTAGGGACTCGCT

a      Q   A   P   V   L   V   V   Y   D   D   N   E   R   P   S   G   I   P   E   R   -

TTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAGCACGGCCACCCTGACCATCAACAGGGTCTGAAGCCGGG
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
AAGAGACCGAGGTTGAGACCCTCGTGCCGGTGGGACTGGTAGTTGTCCCAGCTTCGGCCC

a      F   S   G   S   N   S   G   S   T   A   T   L   T   I   N   R   V   E   A   G   -

GATGAGGCCGACTATTATTGTCAAGTGTGGGATAGTGGTAGTGATCATGTGGTATTCGGC
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
CTACTCCGGCTGATAATAACAGTTTCACACCCTATCACCATCACTAGTACACCATAAGCCG

a      D   E   A   D   Y   Y   C   Q   V   W   D   S   G   S   D   H   V   V   F   G   -

GGAGGGACGAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTC
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
CCTCCCTGCTTCGACTGGCAGGATCCAGTCGGGTTCCGACGGGGGAGCCAGTGAGACAAG

a      G   G   T   K   L   T   V   L   G   Q   P   K   A   A   P   S   V   T   L   F   -

          NotI
          |
CCGCCCTCCTCTGCGCCGCTGGATCCgAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAAC
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
GGCGGGAGGAGACGCCGGCGACCTAGGcTTGTTTTCGACTAGAGTCTTCTTCTGGATTTG

a      P   P   S   S   A   A   A   G   S   E   Q   K   L   I   S   E   E   D   L   N   -

TCACATCACCATCACCATCACTAA
901 -----+-----+-----
AGTGTAGTGGTAGTGGTAGTGATT

a      S   H   H   H   H   H   H   *

```

10.2 Sequenz C8:

NcoI
|

```

CAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCCATGGCGGAGGTGCAGCTGGTGG
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
GTCGGCGACCGAACGACGACGACCGTCGAGTCGGCCGGTACCGCCTCCACGTCGACCACC

  A  A  G  L  L  L  L  A  A  Q  P  A  M  A  E  V  Q  L  V  E  -

AGTCTGGGGGAGGCTTGCTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
TCAGACCCCCCTCCGAACGATGTCGGACCCCCCAGGGACTCTGAGAGGACACGTCTGGAGAC

  S  G  G  G  L  L  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  -

GATTACCTTTAGCGGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
CTAAGTGGAAATCGCCGATACGGTACTCGACCCAGGCGGTCCGAGGTCCCTTCCCCGACC

  F  T  F  S  G  Y  A  M  S  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  -

AGTGGGTCTCATCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TCACCCAGAGTAGATAATCACCATCACCACCATCGTGTATGATGCGTCTGAGGCACTTCC

  W  V  S  S  I  S  G  S  G  G  S  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  -

GCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CGGCCAAGTGGTAGAGGTCTCTGTAAAGGTTCTTGTGCGACATAGACGTTTACTTGTTCGG

  R  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  -

TGAGAGCCGAGGACACGGCCCTATATTACTGTGCGAAACCACCTGGGCGCCAGGAGTACT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
ACTCTCGGCTCCTGTGCCGGGATATAATGACACGCTTTGGTGGACCCGCGGTCCCTCATGA

  R  A  E  D  T  A  L  Y  Y  C  A  K  P  P  G  R  Q  E  Y  Y  -

ATGGTTTCGAGTATTTATTATTTCCCCCTTGGCAACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCG
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TACCAAGCTCATAAATAATAAAGGGGGAACCGTTGACCCCGGTCCCTTGGGACCAGTGGC

  G  S  S  I  Y  Y  F  P  L  G  N  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  -

                                HindIII                               MluI
                                |                                   |
TCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCG
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
AGAGGAGTCGGAGGTGGTTCCCGGGTTTCGAACCTTCTTCCACTTAAAAGTCTTCGTGCGC

  S  S  A  S  T  K  G  P  K  L  E  E  G  E  F  S  E  A  R  V  -

TACAGTCTGCGCTGACTCAGCCGGCCTCGGTGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGACGGCCAGGA
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
ATGTCAGACGCGACTGAGTCGGCCGGAGCCACAGTCACCGGGGTCCTGTCTGCCGGTCTCT

  Q  S  A  L  T  Q  P  A  S  V  S  V  A  P  G  Q  T  A  R  I  -

```

```

TTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAG
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
AATGGACACCCCCTTTGTTGTAACCTTCATTTTCACACGTGACCATGGTCGTCCTTCGGTC

    T   C   G   G   N   N   I   G   S   K   S   V   H   W   Y   Q   Q   K   P   G   -

gCCAGGCCCCCTGTGCTGGTCGTCTATGATGATAGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGC
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
cGGTCCGGGGACACGACCAGCAGATACTACTATCGCTGGCCGGGAGTCCCTAGGGACTCG

    Q   A   P   V   L   V   V   Y   D   D   S   D   R   P   S   G   I   P   E   R   -

GATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCG
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
CTAAGAGACCGAGGTTGAGACCCTTGTGCCGGTGGGACTGGTAGTCGTCCCAGCTTCGGC

    F   S   G   S   N   S   G   N   T   A   T   L   T   I   S   R   V   E   A   G   -

GGGATGAGGCCGACTATTACTGTCTCAGGTGTGGGATAGTAGTAGTGATCTTGTGGTATTCTG
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
CCCTACTCCGGCTGATAATGACAGTCCACACCCTATCATCATCACTAGAACACCATAAGC

    D   E   A   D   Y   Y   C   Q   V   W   D   S   S   S   D   L   V   V   F   G   -

GCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGT
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
CGCCTCCCTGGTTCGACTGGCAGGATCCAGTCGGGTTCCGACGGGGGAGCCAGTGAGACA

    G   G   T   K   L   T   V   L   G   Q   P   K   A   A   P   S   V   T   L   F   -

                                NotI
                                |
TCCCACCCTCCTCTGCGGCCGCTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAA
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
AGGGTGGGAGGAGACGCCGGCGACCTAGGCTTGTTTTTCGACTAGAGTCTTCTTCTGGATT

    P   P   S   S   A   A   A   G   S   E   Q   K   L   I   S   E   E   D   L   N   -

ACTCACATCACCATCACCATCACTAA
901 -----+-----+-----
TGAGTGTAGTGGTAGTGGTAGTGATT

    S   H   H   H   H   H   H   *

```